



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DOCTORADO EN QUÍMICA

**SISTEMAS DE EXTRACCIÓN MEDIANTE
ELECTROMEMBRANA (EME) PARA LA DETERMINACIÓN
DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs)
EN ORINA HUMANA**

TESIS DOCTORAL

Noemí Aranda Merino
Sevilla, Diciembre 2019

**SISTEMAS DE EXTRACCIÓN MEDIANTE ELECTROMEMBRANA
(EME) PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIINFLAMATORIOS NO
ESTEROIDEOS (AINES) EN ORINA HUMANA**

La Directora

La Directora

Fdo.: Dña. Rut Fernández Torres

Profesora Titular de Universidad
Departamento de Química Analítica
Universidad de Sevilla

Fdo.: Dña. Mercedes Villar Navarro

Profesora Titular de Universidad
Departamento de Química Analítica
Universidad de Sevilla

El Director

Fdo. D. Manuel Callejón Mochón

Catedrático de Universidad
Departamento de Química Analítica
Universidad de Sevilla

Memoria presentada por Dña. Noemí Aranda Merino para optar al Título de Doctor en
Química con Mención Internacional por la Universidad de Sevilla.

Fdo.: Dña. Noemí Aranda Merino

Licenciada en Química

**D. FERNANDO DE PABLOS PONS, CATEDRÁTICO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado **“Sistemas de extracción mediante electromembrana (EME) para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en orina humana”**, que constituye la Memoria presentada por Dña. Noemí Aranda Merino para aspirar al grado de Doctor en Química con Mención Internacional, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Doctores Rut Fernández Torres, Mercedes Villar Navarro y Manuel Callejón Mochón, profesores de este Departamento, reuniendo a mi juicio las condiciones necesarias exigidas para este tipo de trabajos.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 12 de diciembre de 2019.

Fdo.: Dr. D. Fernando de Pablos Pons

AGRADECIMIENTOS

“No hay deber más necesario que el de dar las gracias”

(Marco Tulio Cicerón)

A mis Directores de Tesis, D. Manuel Callejón Mochón, Dña. Rut Fernández Torres y Dña. Mercedes Villar Navarro, por confiar en mí para realizar este trabajo e invertir su tiempo en él. Por compartir sus conocimientos conmigo, por sus consejos y por tenderme la mano siempre que lo he necesitado. Pero, sobre todo, gracias por el trato personal recibido, por su apoyo constante, por su dedicación y por su infinita paciencia a lo largo de todos estos años.

A todos los demás componentes y compañeros del Grupo de Investigación FQM-291, por su interés, por su ánimo constante y por contribuir también a que este trabajo haya sido posible. A Miguel Ángel, M^a Jesús, Juan Luís, Cristina y Julia por su continua disposición, compañía, comprensión y por todos los buenos momentos compartidos y también los no tan buenos, porque de todo se aprende.

A todo el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla. A su Director, D. Fernando de Pablos Pons, por permitir la presentación de esta Memoria. A Sofía, Tere, Joaquín y Gustavo por su atención y disponibilidad en todo momento.

Al equipo de Conserjería de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla por animarme las mañanas con sus *“Buenos días”*.

Al *“Programa de Becas de la Fundación Cámara de Sevilla”* y al *“Programa de Ayudas para la Formación del Profesorado Universitario (FPU)”* del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de las correspondientes ayudas que han hecho posible mi dedicación a este trabajo en los últimos 5 años.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Sevilla por las Ayudas del VI Plan Propio de Investigación y Transferencia para el *“Uso de los Servicios Generales de Investigación, US-2018 y US-2019”* y para la *“Movilidad Internacional del Personal Dedicado a la Investigación, US-2017”*

Al Ministerio de Educación y Ciencia a través del Proyecto CTM2015-67902-C-1-P.

Al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través del Proyecto PGC 2018-096608-B-C22.

Al Servicio de Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) y a su personal por disposición y por permitir el uso de sus instalaciones y equipos.

Al Grupo de Investigación *“Transductores Químicos”* del Centro Nacional de Microelectrónica-Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM) y al Grupo de Investigación *“Quimiometría Aplicada”* del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), por acogerme y permitirme llevar a cabo mi trabajo en sus instalaciones durante el tiempo que duró mi estancia allí.

Al Dr. Pavel Kubáň, director del Grupo de Investigación *“Electromigration Methods”* del *“Instituto de Química Analítica de la Academia de Ciencias Checa”*, en Brno, República Checa, por darme la oportunidad de trabajar con él y compartir su tiempo y experiencia conmigo. Thanks to Dr. Pavel Kubáň, Head of the Research Group *“Electromigration Methods”* at the *“Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences”*, Brno, Czech Republic, for giving me the opportunity to work with him and share his time and experience with me. It has been a great pleasure for me.

A mis amigas de toda la vida, porque aunque no nos vemos mucho cada vez que lo hacemos nos echamos unas risas que no tienen precio.

A mi familia. A mi hermano, a mis hermanas y a mi madre por su ayuda incondicional y porque siempre están ahí. Y, en especial, a mis dos diablillos favoritos, mis sobrinos, porque sin saberlo consiguen sacarme una sonrisa hasta en los momentos más duros.

A todos, MUCHAS GRACIAS

A Darío y Alejandro

ÍNDICE

ÍNDICES

ÍNDICE GENERALXV

ÍNDICE DE TABLASXXI

ÍNDICE DE FIGURASXXIII

ÍNDICE DE ABREVIATURASXXIX

ÍNDICE GENERAL

OBJETIVO 1

OBJECT 5

CAPÍTULO 1. Introducción 7

 1.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN12

 1.1.1. Microextracción en fase sólida15

 1.1.2. Microextracción en fase líquida18

 1.2. EXTRACCIÓN MEDIANTE ELECTROMEMBRANA (EME)31

 1.2.1. Características cinéticas y modelos matemáticos.....36

 1.2.2. Parámetros operacionales que influyen en el procedimiento de EME.....41

 1.2.2.1. Membrana líquida soportada (SLM).....41

 1.2.2.2. pH de las fases donadora y aceptora.....45

 1.2.2.3. Voltaje aplicado49

 1.2.2.4. Tiempo de extracción50

 1.2.2.5. Agitación51

 1.2.2.6. Temperatura52

 1.2.3. Evaluación de la eficacia de la extracción52

 1.2.3.1. Factor de enriquecimiento52

 1.2.4. Modos de operación en EME54

 1.2.4.1. Dispositivos que emplean membranas líquidas soportadas55

| | |
|--|------------|
| 1.2.4.2. Dispositivos que emplean membranas líquidas libres | 78 |
| 1.2.5. Otros modos de operación en EME | 83 |
| 1.2.5.1. Extracción mediante electromembrana a bajos voltajes (LV-EME) | 84 |
| 1.2.5.2. Extracción mediante electromembrana pulsada (PEME) | 84 |
| 1.2.5.3. Extracción mediante electromembrana aplicando pulsos de voltajes programados (VS-PEME) | 85 |
| 1.2.5.4. Extracción mediante electromembrana manteniendo constante la intensidad de corriente (CC-EME) | 87 |
| 1.2.5.5. Extracción mediante electromembrana acoplada a otras técnicas | 87 |
| 1.2.6. Configuración y geometría de los electrodos empleados en EME..... | 88 |
| 1.2.6.1. Electrodos con geometría cilíndrica | 89 |
| 1.2.6.2. Electrodos con geometría cilíndrica y en espiral | 90 |
| 1.2.6.3. Electrodo virtual rotatorio..... | 91 |
| 1.2.6.4. Electrodo rotatorio en la fase aceptora..... | 92 |
| 1.2.6.5. Electrodo de punta esférica en la fase aceptora | 94 |
| 1.2.7. Soportes empleados en EME | 95 |
| 1.3. APLICACIONES | 102 |
| 1.4. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS | 111 |
| 1.4.1. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos..... | 115 |
| 1.4.2. Características de los AINEs seleccionados..... | 118 |
| 1.4.2.1. Ácido salicílico | 119 |
| 1.4.2.2. Ketoprofeno | 120 |
| 1.4.2.3. Naproxeno | 120 |
| 1.4.2.4. Diclofenaco | 121 |
| 1.4.2.5. Ibuprofeno..... | 122 |
| REFERENCIAS | 124 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 2. Estudio de los parámetros operacionales que afectan a la extracción mediante electromembrana de antiinflamatorios no esteroideos. Efecto de los contraiones en las fases donadora y aceptora..... | 161 |
|--|------------|

| | |
|--|------------|
| CHAPTER 2. SUMMARY | 163 |
| 2.1. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA | 170 |
| 2.2. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL Y PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN..... | 173 |
| 2.2.1. Fibras huecas porosas de polipropileno..... | 176 |

| | |
|--|------------|
| 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 179 |
| 2.3.1. Optimización de los parámetros operacionales del procedimiento de extracción..... | 179 |
| 2.3.1.1. Elección del disolvente orgánico a emplear como SLM | 180 |
| 2.3.1.2. Influencia del pH de las fases donadora y aceptora | 182 |
| 2.3.1.3. Influencia del volumen de las fases donadora y aceptora | 185 |
| 2.3.1.4. Influencia del voltaje aplicado y del tiempo de extracción | 187 |
| 2.3.1.5. Influencia de la composición de las fases donadora y aceptora | 192 |
| 2.3.2. Validación de la metodología propuesta | 201 |
| 2.3.3. Aplicación a muestras de orina humana..... | 203 |
| REFERENCIAS | 206 |

CAPÍTULO 3. Comparación de la eficacia de la extracción mediante electromembrana de antiinflamatorios no esteroideos empleando distintos dispositivos..... 215

CHAPTER 3. SUMMARY **217**

| | |
|--|------------|
| 3.1. DESCRIPCIÓN DE LOS DISPOSITIVOS EMPLEADOS | 223 |
| 3.1.1. Extracción mediante electromembrana utilizando un dispositivo microfluídico (μ F-EME) | 223 |
| 3.1.1.1. Elección del soporte plano | 227 |
| 3.1.1.2. Elección de la membrana líquida soportada | 229 |
| 3.1.1.3. Optimización de los parámetros operacionales del procedimiento de extracción | 231 |
| 3.1.1.4. Optimización del flujo de fase donadora..... | 232 |
| 3.1.1.5. Influencia del pH de la fase donadora y de la fase aceptora | 234 |
| 3.1.1.6. Influencia del voltaje de extracción..... | 241 |
| 3.1.1.7. Influencia del tiempo de extracción | 242 |
| 3.1.2. Extracción mediante electromembrana utilizando un dispositivo con una configuración para el uso de soportes planos (FM-EME) | 246 |
| 3.1.2.1. Optimización de los parámetros operacionales que influyen en el procedimiento de extracción | 249 |
| 3.1.2.2. Influencia del pH de la fase donadora y de la fase aceptora | 249 |
| 3.1.2.3. Influencia del voltaje y del tiempo de extracción..... | 255 |
| 3.1.2.4. Influencia del volumen de las fases donadora y aceptora | 257 |
| 3.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS..... | 262 |
| REFERENCIAS | 274 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 4. Modificación de la membrana líquida para la extracción mediante electromembrana de antiinflamatorios no esteroideos | 279 |
| CHAPTER 4. SUMMARY | 281 |
| 4.1. MATERIALES DE TAMAÑO NANOMÉTRICO: NANOPARTÍCULAS | 285 |
| 4.1.1. Nanopartículas en Química Analítica | 289 |
| 4.1.2. Nanopartículas metálicas | 290 |
| 4.2. NANOPARTÍCULAS DE PLATA | 291 |
| 4.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata | 292 |
| 4.2.2. Aplicaciones de las nanopartículas de plata | 295 |
| 4.3. PARTE EXPERIMENTAL | 297 |
| 4.3.1. Selección del método de síntesis de nanopartículas de plata | 297 |
| 4.3.2. Caracterización de las nanopartículas de plata..... | 302 |
| 4.3.2.1. Caracterización por espectroscopía ultravioleta-visible..... | 303 |
| 4.3.2.2. Caracterización por microscopía de transmisión electrónica (TEM) . | 305 |
| 4.4. MODIFICACIÓN DE LA MEMBRANA LÍQUIDA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA | 307 |
| 4.4.1. Dispositivo experimental y procedimiento de extracción | 307 |
| 4.4.2. Uso de membranas líquidas modificadas con nanopartículas de plata en sistemas de extracción mediante electromembrana..... | 308 |
| 4.4.2.1. Dispersión por agitación mecánica..... | 309 |
| 4.4.2.2. Transferencia directa de las nanopartículas de plata a la membrana líquida soportada..... | 312 |
| 4.4.2.3. Caracterización de la dispersión de nanopartículas de plata en 1-octanol | 317 |
| 4.4.2.4. Modificación del método de transferencia de nanopartículas de plata | 320 |
| 4.5. USO DE MEMBRANAS LÍQUIDAS MODIFICADAS CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN SISTEMAS DE MICROEXTRACCIÓN MEDIANTE ELECTROMEMBRANA (μ -EME) | 328 |
| 4.5.1. Dispositivo experimental y procedimiento de extracción | 328 |
| 4.5.2. Separación electroforética..... | 330 |
| 4.5.3. Optimización de las condiciones operacionales | 332 |
| 4.5.4. Modificación de la membrana líquida libre con nanopartículas de plata..... | 334 |
| 4.6. MODIFICACIÓN DE LA MEMBRANA LÍQUIDA SOPORTADA CON ALIQUAT®336 COMO CARRIER CATIÓNICO..... | 341 |
| 4.6.1. Estudios previos sobre la estabilidad del sistema..... | 344 |
| 4.6.1.1. Influencia del espesor del soporte | 345 |
| 4.6.1.2. Influencia de la geometría de los electrodos | 350 |
| 4.6.1.3. Alcoholes lineales como membranas líquidas soportadas..... | 353 |

| | |
|--|------------|
| 4.6.2. Modificación de la membrana líquida soportada con Aliquat®336 | 356 |
| 4.6.3. Validación de la metodología propuesta | 362 |
| 4.6.3.1. Aplicación a muestras de orina | 365 |
| REFERENCIAS | 368 |
| | |
| CONCLUSIONES | 379 |
| CONCLUSIONS | 385 |
| | |
| ANEXO. Publicaciones científicas derivadas de la tesis | 389 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Aplicaciones de EME en muestras biológicas para la determinación de fármacos básicos no polares ($\log P > 2.5$).104

Tabla 1.2. Aplicaciones de EME en muestras biológicas para la determinación de fármacos básicos polares ($\log P < 2.5$).106

Tabla 1.3. Aplicaciones de EME en muestras biológicas para la determinación fármacos ácidos.108

Tabla 1.4. Aplicaciones de EME en muestras biológicas para la determinación de biomoléculas.109

Tabla 1.5. Aplicaciones de EME en muestras biológicas para la determinación de iones metálicos.110

Tabla 1.6. Clasificación de los AINEs según su estructura química básica.115

Tabla 1.7. Estructura y características de los AINEs estudiados.123

Tabla 2.1. Condiciones óptimas para la separación y detección cromatográfica de los AINEs estudiados.173

Tabla 2.2. Factores de enriquecimiento obtenidos cuando se emplean 1-heptanol y 1-octanol como SLM en las condiciones operacionales inicialmente seleccionadas.182

Tabla 2.3. Resultados de la combinación de LiOH, NaOH, KOH y CsOH para ajustar el pH de las fases donadora (pH 7) y aceptora (pH 12).194

Tabla 2.4. Comparación del método propuesto con estudios previos publicados.200

Tabla 2.5. Resultados de la validación del procedimiento de EME propuesto.201

Tabla 2.6. Porcentaje de recuperación en muestras de orina diluidas (1:1000) y fortificadas con todos los AINEs estudiados a tres niveles de concentración.....203

| | |
|---|-----|
| Tabla 3.1. Recuperaciones obtenidas cuando el pH de la fase donadora se mantiene a pH 9 (KOH) y la fase aceptora a pH 12 (NaOH) y pH 10 (amoníaco/cloruro de amonio). | 241 |
| Tabla 3.2. Comparación de los resultados obtenidos con los sistemas de EME evaluados. | 268 |
| | |
| Tabla 4.1. Condiciones de síntesis y características estructurales de las AgNPs sintetizadas. | 302 |
| Tabla 4.2. Factores de enriquecimiento obtenidos con las distintas dispersiones de AgNPs en 1-octanol. | 310 |
| Tabla 4.3. Valores de longitud de onda y absorbancia del máximo de absorción de las dispersiones de AgNPs en 1-octanol. | 322 |
| Tabla 4.4. Factores de enriquecimiento obtenidos con cada una de las dispersiones de AgNPs en 1-octanol. | 325 |
| Tabla 4.5. Recuperaciones obtenidas al utilizar 1-octanol y las distintas dispersiones de AgNPs en 1-octanol como FLMs. | 335 |
| Tabla 4.6. Recuperaciones obtenidas al diluir la dispersión 4 de AgNPs en 1-octanol. Los resultados se comparan con los obtenidos con 1-octanol y la propia dispersión 4. | 336 |
| Tabla 4.7. Recuperaciones obtenidas al diluir la dispersión 1 de AgNPs en 1-octanol. Los resultados se comparan con los obtenidos con 1-octanol y la propia dispersión 1. | 337 |
| Tabla 4.8. Recuperaciones obtenidas a distintos tiempos de extracción utilizado 1-octanol como FLM. | 338 |
| Tabla 4.9. Recuperaciones obtenidas a distintos tiempos de extracción utilizando la dispersión 1 de AgNPs en 1-octanol como FLM. | 338 |
| Tabla 4.10. Recuperaciones obtenidas con las diferentes configuraciones de electrodos. | 351 |
| Tabla 4.11. Resultados de la validación del procedimiento de EME propuesto. | 362 |
| Tabla 4.12. Porcentaje de recuperación en muestras de orina diluidas (1:500) y fortificadas a tres niveles de concentración con todos los AINEs estudiados. | 364 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Configuraciones empleadas en HF-LPME. (a). En tres fases. (b). En dos fases. .21

Figura 1.2. Esquema del transporte mediado por *carriers* (*carrier* disuelto en la membrana líquida)25

Figura 1.3. Tipos de geometrías empleadas en HF-LPME para la fibra hueca. (a). U-shaped HF-LPME, (b). Rod-like HF-LPME, (c). Long fiber HF-LPME, (d). Solvent bar microextraction (SBME).....27

Figura 1.4. Esquema del dispositivo PALME.28

Figura 1.5. Esquema del procedimiento de extracción mediante electromembrana (EME) para la extracción de: (a). analitos catiónicos y (b). analitos aniónicos.33

Figura 1.6. Formación de la doble capa eléctrica alrededor de la SLM al aplicar una diferencia de potencial [126].43

Figura 1.7. Estudio del efecto de la electrolisis en EME en presencia de indicadores ácido-base. (a). Rojo congo. (b). Fenolftaleína. [152]48

Figura 1.8. Clasificación de las modalidades de EME [113].55

Figura 1.9. Dispositivo para la EME exhaustiva empleando tres fibras huecas.56

Figura 1.10. Dispositivo para la EME simultánea de analitos ácidos y básicos.57

Figura 1.11. Dispositivo para la EME simultánea de analitos ácidos y básicos formado por dos celdas separadas para la fase donadora.....59

Figura 1.12. Dispositivo para la EME simultánea de analitos básicos de distinta polaridad.60

Figura 1.13. Dispositivo para la EME simultánea de analitos ácidos y básicos de distinta polaridad.61

Figura 1.14. Esquema del dispositivo para la EME dinámica (*dinamic-EME, d-EME*) [165].62

Figura 1.15. Dispositivo para la extracción mediante nano-electromembrana (nano-EME).63

Figura 1.16. Dispositivo para la EME simultánea de analitos ácidos y básicos con láminas de polipropileno como soporte para la SLM.66

| | |
|---|----|
| Figura 1.17. Dispositivo empleado para la extracción mediante electromembrana gota a gota (<i>drop to drop EME</i>) [171]. | 67 |
| Figura 1.18. Dispositivo microfluídico <i>on-chip</i> semi-dinámico (fase donadora móvil, fase aceptora estática) [91]. | 68 |
| Figura 1.19. Dispositivo microfluídico <i>on-chip</i> dinámico (sistema de doble flujo) [89]. | 69 |
| Figura 1.20. Dispositivo microfluídico <i>on-chip</i> semi-dinámico para la extracción simultánea de compuestos básicos de distinta polaridad [150]. | 70 |
| Figura 1.21. Dispositivo microfluídico <i>on-chip</i> semi-dinámico para la extracción simultánea de compuestos ácidos y básicos [146]. | 71 |
| Figura 1.22. Dispositivo microfluídico <i>on-chip</i> semi-dinámico con un solo canal de fase donadora para la extracción simultánea de compuestos ácidos y básicos [174]. | 72 |
| Figura 1.23. Dispositivo para la EME exhaustiva de analitos: (a). ácidos, (b). básicos. | 74 |
| Figura 1.24. Dispositivo para la EME con láminas planas como soporte para la SLM en una configuración vertical. | 75 |
| Figura 1.25. Esquema del dispositivo Pa-EME [183]. | 77 |
| Figura 1.26. Esquema del dispositivo de EME que emplea FLM con una configuración vertical [184]. | 79 |
| Figura 1.27. Esquema del dispositivo de μ -EME. | 81 |
| Figura 1.28. Esquema del dispositivo de μ -EME en cinco fases para la extracción simultánea de especies catiónicas y aniónicas. | 82 |
| Figura 1.29. Esquema del dispositivo de μ -EME en cinco fases para la extracción simultánea de analitos básicos con distintas propiedades. | 83 |
| Figura 1.30. Dispositivo empleado para la EME empleando un electrodo cilíndrico [205]. | 89 |
| Figura 1.31. Configuraciones de electrodos empleadas por H. R. Moazami et al.: (a). clásica, (b). helicoidal, (c). cilíndrica [206]. | 91 |
| Figura 1.32. Electrodo virtual rotatorio [207]. | 92 |
| Figura 1.33. Electrodo rotatorio en la fase aceptora [208]. | 93 |
| Figura 1.34. Dispositivo para la EME empleando un electrodo de punta esférica. | 94 |

| | |
|--|-----|
| Figura 2.1. Cromatogramas correspondientes a la separación cromatográfica de los AINEs estudiados mediante HPLC: (a). Detección por DAD (λ : 250 nm), (b). Detección por FLD. | 172 |
| Figura 2.2. Dispositivo experimental empleado en el procedimiento de EME. | 174 |
| Figura 2.3. Imagen de la estructura porosa de las fibras huecas de polipropileno obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM). | 178 |
| Figura 2.4. Influencia del pH de la fase donadora. %RSD < 11%. | 183 |
| Figura 2.5. Influencia del pH de la fase aceptora. %RSD < 8%. | 185 |
| Figura 2.6. Influencia del volumen de la fase donadora. %RSD < 7%. | 186 |
| Figura 2.7. Influencia del voltaje aplicado. %RSD < 10 %. | 188 |
| Figura 2.8. Influencia del tiempo de extracción. %RSD < 9%. | 190 |
| Figura 2.9. Tendencia de la intensidad de corriente registrada durante la EME en las condiciones óptimas de operación. | 191 |
| Figura 2.10. Efecto de los hidróxidos alcalinos en la extracción mediante electromembrana de AINEs estudiados. %RSD < 11%. | 198 |
| Figura 2.11. Cromatogramas de HPLC correspondientes a las muestras de orina humana sometidas al procedimiento de extracción electrocinética propuesto: (a). Blanco de orina (DAD, λ : 235 nm), (b). Orina fortificada con todos los compuestos a 300 ng mL ⁻¹ (DAD, λ : 235 nm), (c). Orina recogida a las 3 horas de la ingesta de una dosis de 550 mg de NAX (FLD), (d). Orina recogida a las 7 horas de la ingesta de una dosis de 600 mg de IBU (FLD). | 204 |
| Figura 3.1. Esquema del dispositivo microfluídico (μ F-EME) | 224 |
| Figura 3.2. Imagen real del dispositivo microfluídico en funcionamiento. | 225 |
| Figura 3.3. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) correspondientes a: (a). sección transversal y (b). estructura porosa superficial del soporte plano de polipropileno | 229 |
| Figura 3.4. Optimización del flujo de fase donadora. %RSD < 12%. | 234 |
| Figura 3.5. Influencia del pH de la fase donadora. %RSD < 10% | 235 |

| | |
|--|-----|
| Figura 3.6. Influencia del pH de la fase aceptora. %RSD < 10% | 238 |
| Figura 3.7. Influencia del pH de la fase aceptora en presencia de tampones. %RSD < 9% | 240 |
| Figura 3.8. Influencia del voltaje aplicado. %RSD < 10%..... | 242 |
| Figura 3.9. Influencia del tiempo de extracción. %RSD < 12% | 243 |
| Figura 3.10. Tendencia de la intensidad de corriente (a). en las condiciones operacionales óptimas y (b). para un valor de pH 12 (NaOH 10 mM), en la fase aceptora manteniendo los restantes parámetros en sus valores óptimos. | 245 |
| Figura 3.11. Dispositivo experimental empleado en el procedimiento de EME con soportes planos para la SLM. | 247 |
| Figura 3.12. Influencia del pH de la fase donadora empleando KOH (pH de la fase aceptora 12, NaOH 10 mM). %RSD < 11%..... | 250 |
| Figura 3.13. Influencia del pH de la fase donadora empleando disoluciones tampón (pH de la fase aceptora 12, NaOH 10 mM). %RSD < 10%. | 250 |
| Figura 3.14. Influencia del pH de la fase aceptora empleando NaOH (pH de la fase donadora 5, sin ajustar). %RSD < 10%..... | 253 |
| Figura 3.15. Influencia del pH de la fase aceptora empleando tampones (pH de la fase donadora 5.2 (sin ajustar)). %RSD < 9%. | 255 |
| Figura 3.16. Influencia del voltaje aplicado. %RSD < 8%..... | 256 |
| Figura 3.17. Influencia del tiempo de extracción. % < RSD 10.8 % | 257 |
| Figura 3.18. Influencia del volumen de la fase donadora. %RSD < 9%. | 259 |
| Figura 3.19. Tendencia de la intensidad de corriente registrada durante la EME con el dispositivo FM-EME en las condiciones óptimas de operación | 262 |
| Figura 3.20. Cromatogramas de HPLC correspondientes a la EME de: (a ₁) blanco de orina, dispositivo HF-EME (DAD, λ: 235 nm), (a ₂). muestra de orina fortificada (0.3 μg ml ⁻¹), dispositivo HF-EME (DAD, λ: 235 nm), (b ₁). blanco de orina, dispositivo μF-EME (DAD, λ: 235 nm), (b ₂). muestra de orina fortificada (2 μg ml ⁻¹), dispositivo HF-EME (DAD, λ: 235 nm), (c ₁). blanco de orina, dispositivo FM-EME (DAD, λ: 235 nm), (b ₂). muestra de orina fortificada (0.5 μg ml ⁻¹), dispositivo FM-EME (DAD, λ: 235 nm). | 270 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.1. Aplicaciones analíticas de las nanopartículas [31]. | 290 |
| Figura 4.2. Etapas de formación de nanopartículas de plata por reducción química en disolución. | 294 |
| Figura 4.3. Formación y estabilización de las nanopartículas de plata según un procedimiento de reducción química [26]. | 301 |
| Figura 4.4. Espectro de absorción UV-visible de la dispersión de nanopartículas de plata. | 304 |
| Figura 4.5. Imágenes TEM de las AgNPs sintetizadas utilizando NaBH ₄ como agente reductor. | 306 |
| Figura 4.6. Factores de enriquecimiento para las dispersiones de AgNPs en 1-octanol. | 310 |
| Figura 4.7. Espectros de absorción molecular correspondientes a las fases (a). acuosa y (b).orgánica después de la transferencia de las AgNPs a 1-octanol. | 318 |
| Figura 4.8. Imagen de la dispersión de AgNPs en 1-octanol obtenida por TEM. | 320 |
| Figura 4.9. Imágenes obtenidas por TEM, correspondientes a las distintas dispersiones de AgNPs en 1-octanol. (a). Dispersión 1, (b). Dispersión 2, (c). Dispersión 3, (d). Dispersión 4 y (e). Dispersión 5. | 323 |
| Figura 4.10. Factores de enriquecimiento obtenidos tras emplear las dispersiones de AgNPs en 1-octanol como SLM. | 325 |
| Figura 4.11. Tendencia de la intensidad de corriente registrada cuando se emplean (a). 1-octanol modificado con AgNPs y (b). 1-octanol como SLM. | 327 |
| Figura 4.12. Esquema del dispositivo experimental para la μ -EME utilizando membranas líquidas libres. | 329 |
| Figura 4.13. Electroferograma correspondiente a la separación electroforética de una mezcla patrón de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de los AINEs estudiados. | 331 |
| Figura 4.14. Estructura del Aliquat [®] 336. | 341 |
| Figura 4.15. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) correspondientes a: (a ₁). sección transversal y (a ₂). estructura porosa superficial del soporte de 25 μm , (b ₁). sección transversal y (b ₂). estructura porosa superficial del soporte de 65 μm , (c ₁). sección transversal y (c ₂). estructura porosa superficial del soporte de 100 μm . | 346 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.16. Influencia del espesor del soporte. %RSD < 10%. | 347 |
| Figura 4.17. Tendencia de la intensidad de corriente eléctrica registrada con cada tipo de soporte plano. | 348 |
| Figura 4.18. (a). Influencia del voltaje aplicado con la membrana de 100 µm para un tiempo de extracción de 12 minutos. %RSD < 6%. (b). Influencia del tiempo de extracción con la membrana de 100 µm para un voltaje de 120 voltios. %RSD < 6%. | 350 |
| Figura 4.19. Esquema de las distintas configuraciones de electrodos evaluadas. | 352 |
| Figura 4.20. Tendencia de la intensidad de corriente registrada con las diferentes configuraciones de electrodos. | 353 |
| Figura 4.21. Recuperaciones obtenidas con los diferentes alcoholes alifáticos empleados como SLM. %RSD < 10%. | 355 |
| Figura 4.22. Tendencia de la intensidad de corriente registrada al emplear 1-octanol, 1-nonanol y 1-decanol como SLM. | 356 |
| Figura 4.23. Influencia de la concentración de <i>carrier</i> disuelto en 1-octanol. %RSD < 9%. | 357 |
| Figura 4.24. Influencia de la concentración de <i>carrier</i> disuelto en 1-nonanol. %RSD < 9%. | 359 |
| Figura 4.25. Tendencia de la intensidad de corriente registrada cuando se emplean 1-octanol, 1-octanol + 0.25% (p/v) de Aliquat®336, 1-nonanol y 1-nonanol + 2.5% (p/v) de Aliquat®336 como SLM. | 360 |
| Figura 4.26. (a). Influencia del voltaje aplicado usando 1-nonanol + 2.5% p/v Aliquat®336 como SLM a un tiempo de extracción de 12 minutos. %RSD < 7%. (b). Influencia del tiempo de extracción usando 1-nonanol + 2.5% (p/v) Aliquat®336 como SLM a un voltaje de 80 voltios. %RSD < 7%. | 361 |
| Figura 4.27. Cromatogramas obtenidos por HPLC correspondientes las muestras de orina humana sometidas al procedimiento de EME propuesto: (a). blanco de orina (DAD; λ: 235 nm), (b). muestra de orina fortificada con una mezcla de concentración 125 ng mL ⁻¹ para todos los AINEs (DAD; λ: 235 nm), (c). muestra de orina recogida a las 2 horas 30 minutos de la ingesta de una dosis de 500 mg de ASA (FLD) y (d). muestra de orina recogida a las 8 horas de la ingesta de una dosis de 600 mg de IBU (FLD). | 366 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- AgNPs:** Nanopartículas de plata
- AINEs:** Antiinflamatorios no esteroideos
- ATM:** Microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy*)
- CAR:** Carboxen
- CC-EME:** Extracción mediante electromembrana con corriente constante (*Constant-Current Electromembrane extraction*)
- CE:** Electroforesis capilar (*Capilar Electrophoresis*)
- CFME:** Microextracción en flujo continuo (*Continuous Flow Microextraction*)
- CNTs:** Nanotubos de carbono (*Carbon Nanotubes*)
- CTAB:** Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*)
- CW:** Carbowax
- D2EHPA:** Ácido di (2-etilhexil) fosfórico (*Di-2-(ethylhexyl) phosphoric acid*)
- d-EME:** Extracción mediante electromembrana dinámica (*Dynamic Electromembrane extraction*)
- DEME:** Extracción mediante electromembrana dual (*Dual Electromembrane extraction*)
- DIC:** Diclofenaco
- DI-SDME:** Microextracción en gota por inmersión directa (*Direct Immersion-Single Drop Micro-Extraction*)
- DI-SPME:** Microextracción en fase sólida por inmersión directa (*Direct Immersion-Solid-Phase Micro-Extraction*)
- DLLME:** Microextracción líquido-líquido dispersiva (*Dispersive liquid-liquid microextraction*)
- DLS:** Dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*)
- DVB:** Divinil benceno
- EF:** Factor de enriquecimiento (*Enrichment Factor*)
- EME:** Extracción mediante electromembrana (*Electromembrane extraction*)
- ESI-MS:** Espectrometría de masas con sistema de ionización por electrospray (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*)
- FLM:** Membrana líquida libre (*Free Liquid Membrane*)
- FTIR:** Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*)

GC: Cromatografía de gases (*Gas Chromatography*)

GC-MS: Cromatografía de gases-espectrometría de masas (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

HF-LPME: Microextracción en fase líquida con fibra hueca (*Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction*)

HPIM: Fibras de polímeros de impronta molecular (*Hollow Polymer Inclusion Membrane*)

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución-espectrometría de masas (*High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

HPLC-MS: Cromatografía de líquidos de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*)

HS-SDME: Microextracción en gota en espacio cabeza (*Head-Space-Single Drop Micro-Extraction*)

HS-SPME: Microextracción en fase sólida en espacio cabeza (*Head-Space-Solid-Phase Micro-Extraction*)

IBU: Ibuprofeno

IL: Líquido iónico (*Ionic Liquid*)

IL-DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva en líquidos iónicos (*Ionic Liquid-Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*)

IL-EME: Extracción mediante electromembrana con líquidos iónicos (*Ionic-Liquids Electromembrane extraction*)

In-Tube SPME: Microextracción en fase sólida en tubo (*Solid-Phase Microextraction-In Tube*)

In-Tube SPME: Microextracción en fase sólida en punta (*Solid-Phase Microextraction-In Tip*)

ISs: Inmunosorbentes (*Inmunosorbents*)

KTP: Ketoprofeno

LLE: Extracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)

LLLME: Microextracción líquido-líquido-líquido (*Liquid-Liquid-Liquid Microextraction*)

LOD: Límite de detección (*Limit of Detection*)

LOQ: Límite de cuantificación (*Limit of Quantification*)

LV-EME: Extracción mediante electromembrana a bajo voltaje (*Low-Voltage Electromembrane extraction*)

LPME: Liquid-Phase Micro-Extraction

μ-EME: Extracción mediante micro-electromembrana (*micro-Electromembrane extraction*)

- MEPs:** Microextracción por sorbentes empaquetados (*Micro-Extraction by Packed Sorbents*)
- MIPs:** Polímeros de impronta molecular (*Molecular Imprinted Polymers*)
- MNPs:** Nanopartículas metálicas (*Metal Nanoparticles*)
- MOFs:** Redes metalo-orgánicas (*Metal-Organic Frameworks*)
- MW-DLLME:** Microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por microondas (*Microwave-assisted dispersive liquid-liquid microextraction*)
- MW-CNTs:** Nanotubos de carbono de pared múltiple (*Multi wall carbon nanotubes*)
- NAX:** Naproxeno
- PA:** Poliacrilato (*Poly Acrylate*)
- Pa-EME:** Extracción mediante electromembrana en paralelo (*Parallel-Electromembrane extraction*)
- PALME:** Microextracción con membranas planas artificiales en paralelo (*Parallel Artificial Liquid Phase Microextraction*)
- PDMS:** Polidimetilsiloxano (*Poly Dimethyl Siloxane*)
- PEEK:** Poliéter étercetona (*Poly Ether Ether Ketone*)
- PEG:** Polietilenglicol (*Poly Ethylene Glicol*)
- PEME:** Extracción mediante electromembrana usando pulsos de voltage (*Pulsed Electromembrane extraction*)
- PIMs:** Membranas de inclusión polimérica (*Polymer Inclusion Membranes*)
- PMMA:** Polimetilmetacrilato (*Poly Methyl Methacrylate*)
- PP:** Polipropileno (*Polypropylene*)
- PTFE:** Politetrafluoroetileno (*Polytetrafluoroethylene*)
- PVDF:** Fluoruro de polivinilideno (*Poly Vinylidene Fluoride*)
- SAL:** Ácido salicílico
- SBSE:** Extracción en fase sólida por barras magnéticas (*Stir Bar Sorptive Extraction*)
- SDME:** Microextracción en gota (*Single Drop Microextraction*)
- SEM:** Microscopía de barrido electrónico (*Scanning Electron Microscopy*)
- SFODME:** Microextracción en gota orgánica flotante suspendida (*Solidified Floating Organic Drop Microextraction*)
- SLM:** Membrana líquida soportada (*Supported Liquid Membrane*)
- SPDE:** Extracción en fase sólida dinámica (*Solid-Phase Dynamic Extraction*)
- SPE:** Extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*)

SPME: Microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Micro-Extraction*)

SWCNTs: Nanotubos de carbono de una sola pared (*Single Wall Carbon Nanotubes*)

TEHF: Fosfato de *tris*-2-etil hexilo (*Tris (2-ethylhexyl) phosphat*)

TEM: Microscopía de transmisión electrónica (*Transmission Electron Microscopy*)

USAEME: Microextracción de emulsificación asistida por microondas (*Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction*)

UV-vis: Espectroscopía ultravioleta visible (*Ultraviolet Visible Spectroscopy, UV-vis*)

VS-PEME: Extracción mediante electromembrana de pulsos a voltaje programado (*Voltage-Step Pulsed Eelectromembrane extraction*)

XPS: Espectroscopía de fotones de rayos X (*X-Ray Photoelectron Spectroscopy*)

XRD: Difractometría de rayos X en polvo (*X-Ray Powder Diffraction*)

OBJETIVO

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo y empleo de diferentes sistemas de extracción mediante electromembrana (EME) para la puesta a punto y optimización de métodos de extracción que permitan la determinación de principios activos farmacológicos de naturaleza ácida en matrices de origen biológico.

Para ello, se propone el uso de tres dispositivos experimentales que difieren completamente en forma, geometría y estructura. El primero presenta una configuración clásica en la que se utilizan fibras huecas como soporte para la membrana líquida (HF-EME), el segundo es un dispositivo microfluídico (μ F-EME) y el tercero implica una configuración muy poco empleada y que precisa el uso de soportes de geometría plana para fijar la membrana líquida (FM-EME).

Como analitos modelo, se emplearán cinco principios activos pertenecientes a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos: ácido salicílico, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno. A través de este estudio se pretende contribuir a la mejora y el desarrollo de nuevos procedimientos de extracción electrocinética que permitan el análisis de principios activos farmacológicos en matrices biológicas.

En ese sentido, se optimizarán las condiciones experimentales implicadas en la migración de los analitos, buscando que el rendimiento del proceso sea el máximo posible para cada sistema. Al mismo tiempo, se discutirán las ventajas e inconvenientes que ofrecen cada uno de ellos. Los parámetros operacionales que influyen de manera significativa en este tipo de técnicas, como el volumen y el pH de las fases donadora y aceptora, la naturaleza de la membrana líquida, el voltaje y el tiempo de extracción

OBJETIVO

serán evaluados. Así mismo, se llevará a cabo un estudio exhaustivo, para analizar cómo contribuyen a la transferencia de masa tanto la composición de las dos fases implicadas en el proceso como la modificación de la membrana líquida. La determinación de los compuestos se realizará por cromatografía líquida de alta resolución y por electroforesis capilar, empleando detectores de fila de diodos y fluorescencia en el primer caso y únicamente de fila de diodos en el segundo.

Por último, se evaluará la aplicabilidad de los métodos de extracción obtenidos con cada una de los sistemas propuestos, para la determinación de los analitos seleccionados en muestras de orina humana.

OBJECT

The main goal of this Doctoral Thesis is the development and use of different electromembrane extraction (EME) systems to implement and optimize electrokinetic extraction methods that allow the analysis of some acidic pharmacological active ingredients in biological matrices.

For this purpose, the use of three devices with different shapes, geometries and structure is proposed. The first device, has a classical configuration and employs hollow fibers as physical support for the liquid membrane (HF-EME), the second is a microfluidic device (μ F-EME) and the last one presents a less used configuration that requires the use of flat supports to fix the liquid membrane.

Five non-steroidal anti-inflammatory drugs were selected as model analytes: salicylic acid, ketoprofen, naproxen, diclofenac and ibuprofen. This study aims to contribute to improve and develop new electrokinetic extraction procedures to analyze pharmacological active ingredients in biological matrices.

In this way, the experimental conditions involved in the migration of the analytes will be optimized to get the maximum extraction yield as possible with each system. The advantages and disadvantages of each one of them will be also discussed. Operational parameters with a significant influence in this technique, such as the volume and pH of the donor and acceptor phases, the nature of the liquid membrane, the voltage and the extraction time will be evaluated. Likewise, an exhaustive study will be carried out, to determine the influence in the mass transfer of donor and

OBJECT

acceptor solutions composition and the modification of the liquid membrane. The analytes will be analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE), using diode array and fluorescence detectors in the HPLC system and only a diode array detector in the CE system.

Finally, the obtained extraction methods using the different set-up, will be applied for the determination of the selected analytes in human urine samples.

CAPÍTULO 1. Introducción

En las últimas décadas del siglo XX y a comienzos del siglo XXI, el análisis instrumental se ha convertido en uno de los pilares de la Química Analítica moderna. Este hecho ha permitido la extensión de las aplicaciones de esta rama de la química a la resolución de problemas socio-económicos y/o científico-técnicos que implican el análisis de muestras de origen medioambiental, biológico, clínico, industrial e incluso forense. A pesar de la evolución que ha experimentado la instrumentación analítica en los últimos años, especialmente en términos de eficacia, selectividad y sensibilidad, existen una serie de factores que impiden el análisis directo de este tipo de muestras, como son la propia complejidad de las mismas, la presencia de una gran cantidad de especies químicas que pueden interferir durante la medición y que los compuestos de interés suelen encontrarse a niveles que no son detectables [1,2].

De este modo, el análisis de compuestos químicos presentes en concentraciones muy bajas en matrices complejas requiere de un procedimiento analítico que incluya, además del muestreo y el posterior análisis de datos, una etapa previa de preparación y tratamiento de la muestra [3] cuyos objetivos principales son:

(a). Simplificar la matriz de la muestra mediante la eliminación de la mayoría de las especies interferentes y el aislamiento de los compuestos de interés, gracias a lo cual se consigue tanto la preconcentración de los analitos como un eficaz *clean-up* [4-6].

(b). Obtener una muestra que sea compatible con la técnica analítica que se vaya a emplear [7-9].

(c). Garantizar un grado aceptable de selectividad y repetibilidad así como una elevada recuperación de los analitos [10,11].

La necesidad de disponer de los analitos en la forma más adecuada para su análisis y de garantizar la recuperación cuantitativa de los mismos, hace que la etapa de preparación y tratamiento de muestra sea, generalmente, la más lenta y compleja en cualquier procedimiento analítico, sobre todo cuando se analizan muestras de origen biológico o medioambiental. En general, consume, aproximadamente, un 80% del tiempo total de análisis ya que, suele ir acompañada de etapas de precipitación, centrifugación, filtración o dilución. Así mismo, es la etapa más propensa a introducir errores, siendo responsable de, prácticamente, el 30% de las fuentes de error [6] a pesar de que todas y cada una de las etapas del procedimiento analítico, desde el muestreo hasta el procesamiento final de datos, llevan asociados errores que comprometen la calidad de los resultados obtenidos [3]. Aunque a menudo se pasa por alto la importancia de la preparación de la muestra, lo cierto es que, en realidad, es la etapa que requiere mayor atención, dado que influye directamente en la eficacia, la exactitud y la precisión de los resultados finales [11,12]. En ocasiones, presenta bajos rendimientos, está sujeta a pérdidas, a la introducción de contaminantes y es difícil de automatizar [3]. A todo esto, se ha de sumar el elevado consumo de muestra y de reactivos que, en algunos casos son caros, tóxicos y/o altamente contaminantes. Por lo tanto, podría decirse que esta etapa constituye el talón de Aquiles de cualquier procedimiento analítico.

La capacidad de identificación y/o cuantificación de los analitos con la instrumentación disponible actualmente, contrasta con la lentitud y la laboriosidad de los procedimientos de preparación y tratamiento de muestra, lo que pone de manifiesto que, en un principio, sólo se han producido avances en una parte del proceso analítico, centrados fundamentalmente en mejorar la separación y detección de los analitos, quedando la etapa de tratamiento de muestra en un segundo plano [9]. Por este motivo, la consecución de mejoras en los métodos de análisis químico depende, en gran medida, del desarrollo de técnicas de preparación de muestras innovadoras, rápidas y precisas [13].

En general, las condiciones que debe cumplir una técnica ideal de preparación de muestra son que deber ser simple, rápida, selectiva, eficiente, sin disolventes (libre de disolventes) o compatible con el medioambiente, económica y ofrecer recuperaciones elevadas y resultados reproducibles sin que exista la posibilidad de degradación del analito. Así mismo, ha de ser susceptible de automatización, compatible con diferentes métodos de análisis y capaz de aislar y concentrar compuestos de distinta naturaleza [6,14]. Por esta razón, la etapa de preparación de muestra está en constante evolución. En los últimos años, se ha incrementado el interés por promover nuevas técnicas o, en su defecto, por la modificación de las ya existentes con el fin de hacerlas más rápidas, simples, sensibles, selectivas, potentes y versátiles [13,15]. En ese sentido, las áreas que han recibido mayor atención son la automatización y la miniaturización [16-21]. En el primer caso, se han implementado sistemas de análisis on-line que implican el acoplamiento de la técnica de tratamiento de muestra con el método de detección empleado. De esta forma, se consiguen procedimientos analíticos más rápidos, sensibles y robustos ya que se

reducen el número de etapas de preparación de muestra y, consecuentemente, los costes, los tiempos de análisis así como las posibles contaminaciones y pérdidas de muestra derivadas de la manipulación personal. Todo esto permite, además, la detección de especies químicas presentes a nivel de ultra-trazas en muestras con matrices complejas [6, 14]. Actualmente, las técnicas de preparación de muestras se pueden combinar con cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases-masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de alta resolución-masas (HPLC-MS) y electroforesis capilar (CE) [6]. Por su parte, la miniaturización, es la tendencia más empleada en la preparación de muestra en el campo de la Química Analítica debido a que ofrece numerosas ventajas frente a las técnicas tradicionales. De este modo, minimizando la cantidad de muestra se reduce también el consumo de reactivos y de disolventes caros y tóxicos, los costes y la producción de residuos, lo que contribuye a satisfacer la creciente demanda de métodos más ecológicos y económicos que se encuentren dentro de las líneas de la denominada “Química Verde” [22,23].

1.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

En general, los procedimientos de preparación y tratamiento de muestras que se usan actualmente con mayor frecuencia derivan fundamentalmente de dos técnicas de extracción clásicas: la extracción en fase sólida (*solid-phase extraction, SPE*) y la extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction, LLE*). La elección de uno u otro dependerá de las propiedades físicas y químicas de los analitos, del tipo de matriz en el que se encuentren y, finalmente, del método que se vaya a emplear para su análisis [16,24,25].

La extracción líquido-líquido (LLE), es una de las técnicas clásicas de preparación de muestras más antiguas y, probablemente, una de la más empleadas para la separación y preconcentración de compuestos orgánicos en muestras acuosas. Su popularidad se debe, principalmente, a que es una técnica simple, ya que no precisa una instrumentación muy complicada siendo además una técnica muy versátil [8,26,27]. No obstante, presenta numerosos inconvenientes pues los procedimientos de extracción son largos e implican varias etapas, lo que aumenta el riesgo de contaminación de la muestra, el tiempo de análisis, el consumo de grandes cantidades de disolventes orgánicos que son caros, potencialmente tóxicos y peligrosos para el medioambiente así como la dificultad de automatización debido a que, con frecuencia, se forman emulsiones. Además, su selectividad es limitada ya que a menudo se extraen varios componentes de la matriz de la muestra, dando lugar a interferencias en la determinación analítica [1,12,28,29]. Todo ello, unido a la tendencia actual de miniaturización, hace que la extracción líquido-líquido no sea la mejor opción para la etapa de tratamiento de muestra.

A finales de los años 70, surge la extracción en fase sólida (SPE), una técnica de preparación y tratamiento de muestra basada en la retención selectiva de los analitos presentes en muestras líquidas sobre un adsorbente sólido que recibe el nombre de fase estacionaria que en ocasiones ha sido considerada como una versión miniaturizada de la cromatografía de líquidos clásica [3]. En función de la afinidad que tengan los analitos por el adsorbente quedarán más o menos retenidos, por lo que la elección del mismo que mejor se adecúe tanto a las características del analito como a las de la muestra en la que se encuentra es crucial para

asegurar la eficacia del proceso. Una de las principales ventajas que tiene la extracción en fase sólida, es que existen una gran variedad de fases estacionarias, lo que la convierte en una técnica muy versátil dado que es posible aumentar la selectividad de la misma simplemente modificando el tipo de sólido [30]. Así, en poco tiempo, se convirtió en una de las sustitutas preferidas de la LLE ya que, además, emplea una instrumentación sencilla, requiere volúmenes más bajos de disolventes orgánicos y no se forman emulsiones durante la extracción lo que facilita la automatización de la misma así como el acoplamiento con los métodos instrumentales de análisis. Sin embargo, entre sus principales limitaciones cabe mencionar la posibilidad de que se produzcan pérdidas debido a que consta de varias etapas, de que se den bajas recuperaciones si algún componente de la muestra impide la interacción entre el analito y el sólido adsorbente, la baja capacidad de absorción de algunos de los sólidos que se utilizan como fase estacionaria, tiempos de operación considerablemente largos y, en ocasiones, la falta de reproducibilidad entre adsorbentes de distintos lotes. [2,13,14,31]. Por otro lado, los volúmenes de disolvente orgánico que necesita, a pesar de ser menores que los que se precisan en LLE, son lo suficientemente grandes como para que la SPE no pueda ser considerada como una técnica “verde” [29,32].

Así pues, con el objetivo de reducir las limitaciones que llevan asociadas los métodos clásicos, se han desarrollado técnicas de microextracción basadas en los mismos principios de separación de la LLE y la SPE pero que emplean una configuración miniaturizada de las mismas, las cuales se describen a continuación [33, 34].

1.1.1. Microextracción en fase sólida

En 1990, C. Arthur y J. Pawliszyn [35], introdujeron la microextracción en fase sólida (solid phase microextraction, SPME), un nuevo procedimiento de tratamiento de muestra que elimina el uso de disolventes. Se trata de una versión miniaturizada de la SPE que utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un sólido adsorbente para extraer y preconcentrar los compuestos de interés [3,28]. Se basa en el establecimiento de un equilibrio entre los compuestos presentes en la muestra y la fibra, tras lo cual los compuestos que han quedado retenidos se desorben en un sistema de detección apropiado para su posterior separación y cuantificación [3,11,28,36,37]. Existen dos tipos básicos de muestreo en SPME: la extracción directa (*direct immersion solid phase microextraction, DI-SPME*), para extraer analitos que se encuentran en disolución y la extracción en espacio cabeza (*head space, solid phase microextraction, HS-SPME*), para extraer analitos volátiles [11,37]. Desde su aparición se convirtió rápidamente en una de las técnicas de preparación de muestra más populares, especialmente desde que se comercializaron las primeras fibras en 1993 [4,36].

La elección adecuada del sólido adsorbente es de gran importancia, ya que afecta al rendimiento general del proceso y, sobretodo, a la selectividad del mismo [30]. Los recubrimientos que más se utilizan en las fibras comerciales son el polidimetilsiloxano (PDMS), el poliacrilato (PA), el divinil benceno (DVB), el carboxen (CAR), el polietilenglicol (PEG) y el carbowax (CW) así como recubrimientos mixtos en los que se combinan varios de estos polímeros (PDMS/DVB, CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS) y que

aumentan la capacidad de retención debido a que poseen una elevada superficie específica [10,36-38].

Entre sus principales ventajas se encuentran su bajo coste, el uso de pequeños volúmenes de muestra, la reducción o eliminación del consumo de disolventes orgánicos, la disminución de los tiempos de análisis, la simplicidad de su manejo y su elevada sensibilidad. Esto último, ha permitido el análisis de especies químicas, tanto orgánicas como inorgánicas, presentes a nivel de trazas o ultra trazas en muestras medioambientales, biológicas, clínicas o alimentarias, la mayoría de ellas con matrices de elevada complejidad [1,4,5,10,30,39-42]. A todo esto, hay que sumar la posibilidad de automatización del proceso ya que se puede acoplar fácilmente a cromatografía de gases (GC) [43,44], cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [45-47] y electroforesis capilar (CE) [48,49].

Así pues, la SPME constituye un avance significativo en el campo de la preparación de muestra al satisfacer gran parte de los requisitos de una técnica ideal de tratamiento de muestra. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como la limitada vida útil de las fibras debido a la fragilidad mecánica del soporte de sílice fundido y a la posibilidad de desprendimiento del recubrimiento [13,50], afectando a la reproducibilidad de la técnica. Además, el coste de las fibras es elevado, por lo que, a menudo, se reutilizan varias veces, lo que origina problemas de contaminación cruzada y efecto memoria (*carry over*) [31,39]. Por otra parte, algunos de los recubrimientos disponibles comercialmente tienen una baja estabilidad física, química y térmica, lo que limita su uso para determinados tipos de aplicaciones, [3,10] así como una baja selectividad,

lo que conduce a un importante efecto matriz y a la presencia de interferencias cuando se analizan muestras complejas [1]. Por todo ello, la búsqueda de nuevos soportes así como el desarrollo de nuevos recubrimientos que superen estos inconvenientes se ha convertido en un tema de investigación activo. A fin de mejorar la estabilidad mecánica de la fibra, se han propuesto soportes metálicos de acero inoxidable, titanio, oro, platino o aleaciones y, más recientemente, el uso de fibras huecas de polipropileno. Estas últimas constituyen una buena alternativa debido a su resistencia y, sobre todo, a su bajo coste [1,4,39,51,52]. Así mismo, se han desarrollado una amplia variedad de nuevos recubrimientos encaminados a mejorar la selectividad y la capacidad de absorción [13]. La mayoría de ellos se preparan a través de rutas sintéticas basadas en la tecnología sol-gel e incluyen líquidos iónicos (ILs), grafeno y materiales derivados como nanotubos de carbono (CNTs), inmunosorbentes (ISs), polímeros de impresión molecular (MIPs), nanopartículas metálicas (MNPs) y redes metalo-orgánicas (MOFs) entre otros [6,10,30,36,37].

En los últimos años, se han propuesto también una serie de modificaciones de la técnica original para mejorar la calidad de los resultados y adaptar el procedimiento de SPME a aplicaciones nuevas y más exigentes [1]. Entre ellas, cabe destacar la microextracción en fase sólida en tubo (*in-tube SPME*), la extracción en fase sólida dinámica (*solid-phase dynamic extraction, SPDE*), la extracción en fase sólida sobre barras magnéticas agitadoras (*stir bar sorptive extraction, SBSE*), la microextracción por sorbentes empaquetados (*microextraction by packed sorbent, MEPS*) y la microextracción en fase sólida en punta (*in-tip SPME*). [11].

1.1.2. Microextracción en fase líquida

La creciente demanda de métodos de extracción que se ajusten a los principios ecológicos de la “Química Verde”, derivó en el desarrollo de técnicas de extracción alternativas a la SPME que, de forma genérica, se denominan procedimientos de microextracción en fase líquida (*liquid phase microextraction, LPME*) [34]. En estos sistemas, los analitos pasan desde una fase donadora de naturaleza acuosa hasta un pequeño volumen (del orden de los microlitros) de fase aceptora a través de una membrana líquida que actúa como barrera selectiva.

La microextracción en fase líquida o LPME, es un formato miniaturizado de la clásica LLE que supera muchas de las desventajas de ésta, así como algunas de la SPME [28,53]. Su popularidad se debe, fundamentalmente, al empleo de volúmenes reducidos de disolvente orgánico, a su simplicidad, bajo coste, menores tiempos de extracción y a una menor manipulación de la muestra. Además, la elevada relación entre los volúmenes de fases permite obtener altas preconcentraciones, lo que se traduce en un aumento de la sensibilidad [8,29,34]. Desde su aparición, se han desarrollado diferentes modalidades entre las que cabe destacar la microextracción en gota (*single drop microextraction, SDME*), la microextracción en fase líquida usando fibras huecas (*hollow fiber liquid phase microextraction, HF-LPME*) y la microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME*) [54].

La microextracción en gota (SDME), es la modalidad más simple de las técnicas de LPME. Se basa en la distribución de los analitos presentes en una muestra acuosa (fase donadora) en una gota de disolvente orgánico

(fase aceptora). En una primera variante, desarrollada en 1996 por H. Liu y P.K. Dasgupta [55], y, paralelamente, por M.A. Jeannot y F.F. Cantwell [56], la gota de disolvente orgánico se suspende en el extremo de una varilla de teflón que se sumerge en el seno de la disolución acuosa. Posteriormente, en 1997, Y. He y H.K. Lee [57] y M.A. Jeannot y F.F. Cantwell [58], nuevamente, proponen una nueva versión en la que la gota se mantenía suspendida en la punta de una aguja de inyección cromatográfica. Una vez finalizada la extracción, la gota se recoge y se inyecta en el sistema de detección correspondiente para la cuantificación de los analitos. En este caso, las recuperaciones de la extracción vendrán determinadas por el coeficiente de reparto de los analitos entre el disolvente orgánico y el agua.

Desde la introducción de la SDME, se han desarrollado diferentes modalidades de la misma: microextracción en gota por inmersión directa (*direct inmersión single drop microextraction, DI-SDME*), microextracción en gota en espacio cabeza (*head space single drop microextraction, HS-SDME*), microextracción en flujo continuo (*continuous flow microextraction, CFME*) y microextracción líquido-líquido-líquido (*liquid-liquid-liquid microextraction, LLLME*) [28].

Se trata de una técnica rápida, sencilla, de bajo coste, que no requiere una instrumentación muy compleja y que elimina el efecto memoria, ya que la gota se renueva después de cada extracción [12,36,59]. Así mismo, en comparación con la LLE tradicional, el consumo de disolventes orgánicos disminuye drásticamente, con volúmenes de gota comprendidos entre 1 y 10 microlitros [11,27]. No obstante, su principal limitación es la falta de robustez debido a la inestabilidad de la gota, que

puede desprenderse fácilmente durante la agitación de la muestra [9,12,29]. Además, no es adecuada para el análisis de muestras “sucias” ya que las partículas sólidas aumentan la inestabilidad de la gota y sería necesaria una etapa adicional para así evitar el deterioro del instrumento analítico de medida [8,9,12,29].

Para abordar algunos de estos problemas, S. Pedersen-Bjergaard y K.E. Rasmusen [60], introdujeron el uso de fibras huecas porosas que actúan como barrera física entre las fases donadora y aceptora a la vez que sirven de soporte para el disolvente orgánico. De este modo, y a partir de las bases previamente establecidas por G. Audunsson [61] y E. Thordarson [62], se originó una nueva técnica denominada microextracción en fase líquida usando fibras huecas (*hollow fiber liquid phase microextraction, HF-LPME*).

En este tipo de LPME la fibra hueca se sumerge en el disolvente orgánico, de modo que éste queda inmovilizado en los poros de la fibra por capilaridad, formando una película a su alrededor que se conoce como membrana líquida soportada (*supported liquid membrane, SLM*). Para evitar que la membrana líquida se pierda, el disolvente debe ser poco volátil e inmiscible en agua. A continuación, la fibra se llena con la fase aceptora y se introduce en la muestra acuosa, de manera que los compuestos de interés se extraen desde ésta (fase donadora) hasta la disolución contenida en el interior de la fibra hueca (fase aceptora) a través de la capa de disolvente orgánico que la recubre. Para acelerar la migración de los analitos, la muestra se agita constantemente durante todo el tiempo que dura la extracción [12].

Según la naturaleza de la fase aceptora se distinguen dos modalidades de trabajo: en dos fases y en tres fases (Figura 1.1).

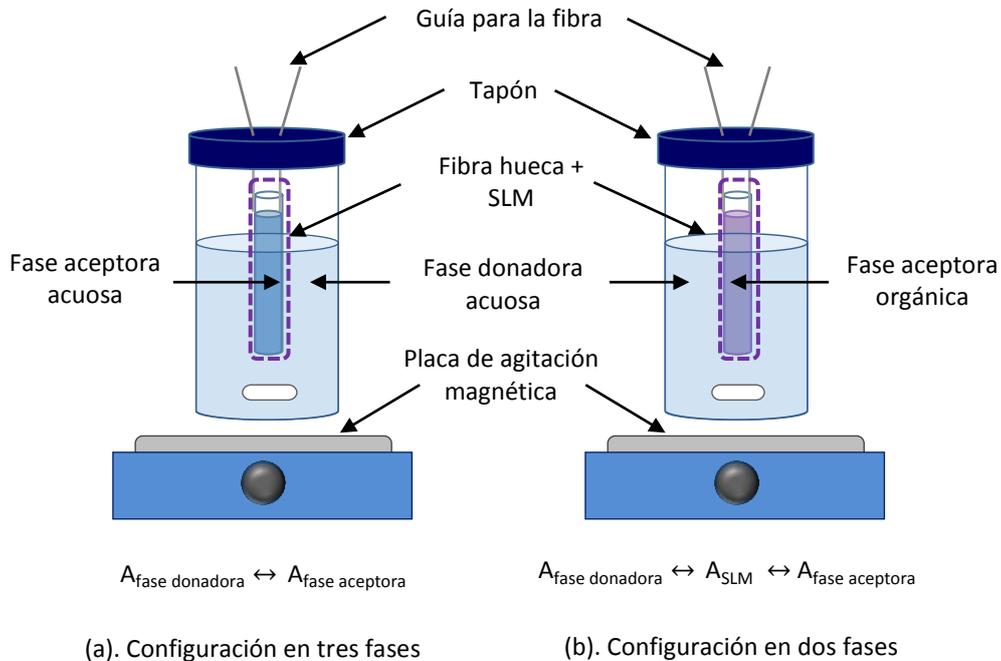


Figura 1.1. Configuraciones empleadas en HF-LPME. (a). En tres fases. (b). En dos fases.

En la configuración en dos fases, la fase aceptora es el mismo disolvente orgánico que compone la SLM de manera que el extracto final es una fase orgánica compatible con técnicas analíticas como la cromatografía de gases (GC). Sin embargo, el análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o electroforesis capilar (CE), se requiere la evaporación del disolvente y la posterior reconstitución de la muestra en un medio acuoso [8]. La transferencia de masa se produce por difusión pasiva a través de la membrana líquida, por lo que el analito debe encontrarse en forma neutra en la fase donadora. Por otra parte, la eficacia de la extracción, además del pH, va a depender también del tipo de

disolvente orgánico presente en la fase aceptora y, por lo tanto, del coeficiente de distribución ($\log P$) del analito entre ambas fases. El disolvente orgánico que se utiliza como fase aceptora, debe tener una polaridad acorde a la naturaleza de los analitos que se vayan a extraer, por lo que la elección adecuada del mismo es de gran importancia para que la extracción se lleve a cabo con éxito. Este modo de trabajo comprende una sola interfase, y se aplica, principalmente, a la extracción de compuestos apolares [11,12].

En la configuración en tres fases, los compuestos migran desde una fase donadora acuosa hasta una fase aceptora, también acuosa, situada en el interior de la fibra a través de un disolvente orgánico inmovilizado en los poros de la fibra formando la SLM. En este modo de trabajo, la fase orgánica actúa únicamente como barrera impidiendo la mezcla de las dos disoluciones acuosas, por lo que se forman dos interfaces. Al igual que en la configuración en dos fases, la transferencia de masa responde a un mecanismo de difusión pasivo pero, en este caso, la eficacia de la extracción, además del coeficiente de distribución del analito entre ambas fases, va a depender, fundamentalmente, del pH de las mismas. De este modo, para lograr buenas recuperaciones, los analitos deben encontrarse en forma iónica, siendo necesario mantener un elevado gradiente de pH a través de la membrana líquida. Se aplica al análisis de compuestos tanto ácidos como básicos con grupos ionizables, por lo que la elección de un disolvente orgánico de polaridad adecuada va a influir también en la eficacia del proceso [11,12]. Al ser la fase donadora de naturaleza acuosa, su análisis se asocia con técnicas de cromatografía líquida (HPLC) o de electroforesis capilar (CE) [63].

Aunque lo normal es que en la configuración en tres fases la fase aceptora sea acuosa, se han descrito también trabajos en los que la fase aceptora es un disolvente orgánico inmiscible con el que se utiliza para formar la SLM [64].

Las fibras huecas que se utilizan como soporte para la membrana líquida, deben estar hechas de un material poroso e hidrófobo. Para este tipo de aplicaciones, generalmente, se emplean fibras de difluoruro de polivinilideno (PVDF), de politetrafluoroetileno (PTFE) y de polipropileno (PP) [28,29,65,66]. De estas tres, las fibras de polipropileno son, con diferencia, las más utilizadas, pues son más económicas, proporcionan mejores resultados y son compatibles con una amplia variedad de disolventes orgánicos [11,36].

Por otra parte, la inmovilización del disolvente orgánico en los poros de la fibra hace que la SLM sea muy estable, gracias a lo cual las muestras puedan agitarse vigorosamente para acelerar la cinética de la extracción sin que se pierda la fase orgánica, al contrario de lo que ocurría en la SDME. Así pues, la HF-LPME se considera como una técnica fiable, robusta y con cierta capacidad de automatización mediante el acoplamiento en línea a varios sistemas instrumentales [9,27,67,68], y que puede proporcionar elevados factores de enriquecimiento debido a la mayor relación de volúmenes que existe entre las fases donadora y aceptora y a la elevada superficie de contacto entre la fase donadora y la SLM, lo que se traduce en un aumento de la sensibilidad [8,28]. Todo ello, ha contribuido a que esta modalidad de microextracción en fase líquida sea la más utilizada. Sin embargo, su principal limitación es la baja velocidad de difusión de los compuestos a través de la membrana líquida, ya que

depende del coeficiente de reparto de éstos entre las fases donadora y aceptora y, en la mayoría de los casos, implica elevados tiempos de extracción [4,69].

Además, en el caso de compuestos de elevada polaridad, los coeficientes de reparto son tan bajos que, prácticamente, no se produce la extracción de los mismos. Para lograr la extracción de este tipo de compuestos, se propuso una tercera modalidad en la que un compuesto auxiliar se añade al medio para facilitar el paso de los analitos a la fase aceptora, normalmente por la formación de una molécula neutra o un par iónico. Estos compuestos, reciben el nombre de transportadores o *carriers* y contribuyen a mejorar la extracción de una gran variedad de especies químicas con diferentes propiedades [70-72]. Pueden añadirse tanto al disolvente orgánico inmovilizado en los poros de la fibra [71,73] como a la fase donadora en la que los analitos se encuentran previamente ionizados [74,75].

A. Carrier disuelto en la membrana líquida

Cuando el *carrier* se disuelve en el disolvente orgánico, se forma un complejo neutro entre el *carrier* disuelto en la membrana líquida y el analito presente en la fase donadora. En una configuración en dos fases, el complejo pasa a la fase aceptora orgánica, donde permanece como par iónico, manteniéndose así la neutralidad de la misma. En una configuración en tres fases, el complejo pasa a la SLM y cuando alcanza la interfase entre ésta y la fase aceptora el analito se intercambia por los contraiones presentes en la misma, formando un par iónico con el *carrier* que vuelve a la membrana líquida. Una vez ahí, comienza un nuevo ciclo donde el

contraión procedente de la fase aceptora se intercambia con los analitos presentes en la fase donadora (Figura 1.2).

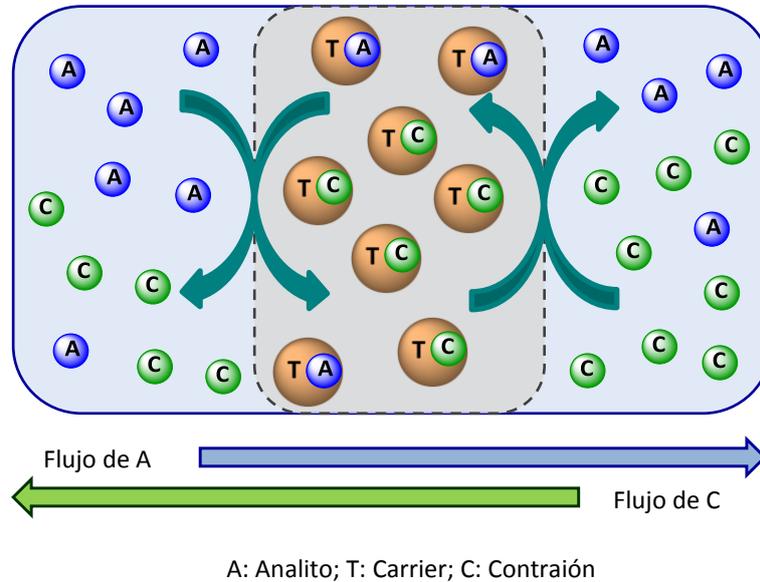


Figura 1.2. Esquema del transporte mediado por *carriers* (*carrier* disuelto en la membrana líquida)

B. Carrier disuelto en la fase donadora

En este caso, el *carrier* se añade a la fase donadora formando par iónico hidrofóbico en la fase donadora que atraviesa el disolvente orgánico en dirección a la fase aceptora. En una configuración en dos fases, el par iónico permanecería como tal en la fase aceptora orgánica, mientras que en una configuración en tres fases el *carrier* libera al analito en la fase aceptora y forma un nuevo par iónico con los contraiones presentes en la misma que vuelve a la fase donadora, donde se inicia un nuevo ciclo de transporte e intercambio.

De este modo, los compuestos catiónicos se extraen con *carriers* aniónicos y los aniónicos se extraen con *carriers* catiónicos. Se han publicado diversos trabajos en los que se propone el uso diferentes tipos de *carriers* disueltos, tanto en la fase donadora como en la membrana líquida, siendo esta última la que presenta un mayor número de aplicaciones. Para la extracción de analitos básicos, los *carriers* que más se utilizan son el ácido octanoico ($C_8H_{16}O_2$) [70,76] cuando se disuelve en la fase donadora y el ácido di (2-etilhexil) fosfórico (D2EHPA) y el tris (2-etilhexil) fosfato (TEHP) [77-80] cuando se disuelve en la membrana líquida. Por su parte, para la extracción de analitos ácidos, el *carrier* más empleado es el cloruro de N-metil-N,N,N trioctil amonio (Aliquat®336) disuelto en la membrana líquida [81-84].

Dependiendo de la disposición de la fibra hueca así como de la configuración empleada, se conocen diferentes modos de operación para HF-LPME (Figura 1.3):

- a. Configuración en forma de U, con ambos extremos abiertos o cerrados (*U-shaped HF-LPME*) [60].
- b. Configuración en forma de vara, con un extremo cerrado y el otro conectado a una punta de jeringa (*rod-like HF-LPME*) [85,86].
- c. Configuración en espiral (*long fiber HF-LPME*). Similar a la configuración en U pero con una fibra de mayor longitud [87].
- d. Microextracción en cápsula de disolvente (*solvent bar microextraction, SBME*) [88].

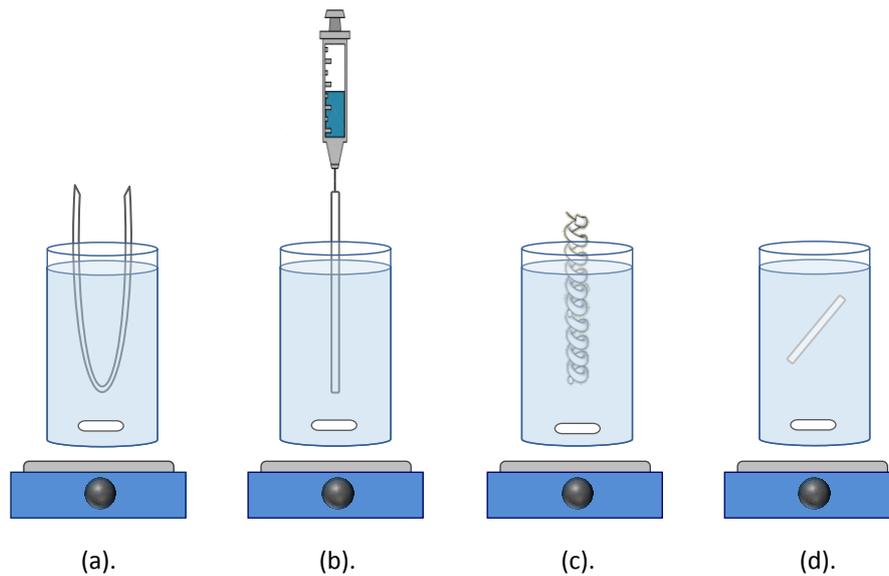


Figura 1.3. Tipos de geometrías empleadas en HF-LPME para la fibra hueca. (a). U-shaped HF-LPME, (b). Rod-like HF-LPME, (c). Long fiber HF-LPME, (d). Solvent bar microextraction (SBME).

También se conocen sistemas de microextracción en fase líquida que emplean dispositivos microfluídicos con láminas planas de polipropileno como soporte para la SLM, los cuales se describen con más detalle en el apartado 1.2.4.1 de la Memoria. Estos sistemas, pueden operar en modo dinámico [89,90] o semi-dinámico [91], según que ambas fases o sólo una de ellas se mantengan en movimiento, respectivamente.

En 2013, A. Gjelstad et al. [94] introdujeron una variante de manejo, a priori, más fácil: la microextracción con membranas planas artificiales en paralelo (*parallel artificial liquid microextraction, PALME*). El principio de extracción es idéntico al descrito anteriormente para HF-LPME, con la diferencia de que emplea una configuración completamente distinta, con láminas planas fluoruro de polivinilideno (PVDF) que sustituyen a la fibra

hueca de polipropileno como soporte para la SLM. Utiliza placas planas de 96 pocillos (96-well plate) compuestas por dos bandejas superpuestas. En la bandeja inferior se coloca la fase donadora, mientras que en la bandeja superior, que lleva incorporados los soportes planos, se sitúa la fase aceptora. De este modo, ambas fases quedan separadas por la membrana líquida situada en el soporte plano en una configuración tipo “sándwich” (Figura 1.4). La principal ventaja de este tipo de sistemas es que permiten llevar a cabo varias extracciones de forma simultánea.

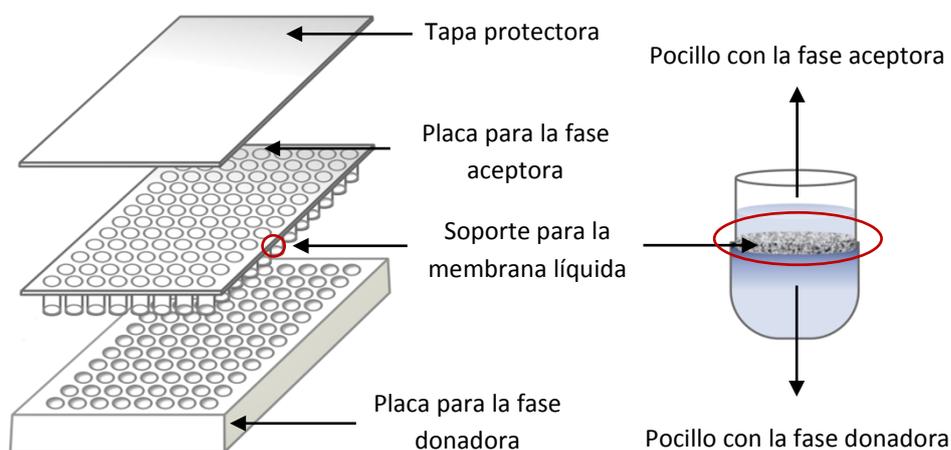


Figura 1.4. Esquema del dispositivo PALME.

Esta modalidad se ha aplicado con éxito al análisis de fármacos ácidos y básicos en muestras de sangre y plasma humano [93-96], por lo que parece ser una herramienta de análisis prometedora, pues entre otras ventajas permite realizar varias extracciones de forma simultánea. Sin embargo, aún está en desarrollo por lo que se requieren estudios adicionales para evaluar su aplicabilidad con otros tipos de compuestos y muestras.

En 2006, M. Rezaee et al. [97], desarrollaron una nueva técnica de microextracción en fase líquida, llamada microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME*) para la determinación de pesticidas en muestras de agua. Utiliza un sistema de tres componentes en el que se añaden, rápida y simultáneamente, a la muestra acuosa un disolvente apolar (extractante) y un disolvente polar (dispersante). El disolvente extractante debe ser inmisible con agua y tener mayor densidad que ésta, mientras que el disolvente dispersante debe ser miscible tanto con agua como con el disolvente extractante. A continuación, la mezcla se agita, formándose una dispersión turbia que, posteriormente, se centrifuga para sedimentar las partículas de disolvente extractante enriquecidas con los analitos de interés que, finalmente, se recogen para su análisis.

Se trata de una técnica simple, rápida, eficaz y de bajo coste que requiere pequeños volúmenes de disolvente orgánico (del orden de los microlitros), lo que permite obtener elevados factores de enriquecimiento como resultado de la elevada relación superficial entre la muestra y las pequeñas gotas del disolvente de extracción. Sin embargo, la técnica es difícil de automatizar y el número de disolventes que se pueden emplear como extractantes es reducido debido a los requisitos que han de cumplir [27,31,54,98,99].

Al igual que en las técnicas anteriores, se han descrito diversas variantes que introducen alguna modificación en el procedimiento original, entre las que destacan: microextracción de emulsificación asistida por microondas (*ultrasound-assisted emulsification microextraction, USAEME*) [100], microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por microondas

(*microwave- assisted dispersive liquid-liquid microextraction, MW-DLLME*) [101], microextracción en gota orgánica flotante solidificada (*solidified floating organic drop microextraction, SFODME*) [102] y la microextracción líquido-líquido dispersiva en líquidos iónicos (*ionic liquid- dispersive liquid-liquid microextraction, IL-DLLME*). [103]. En éste último caso, los disolventes orgánicos que se usan como fase extractante se sustituyen por líquidos iónicos (ILs).

El uso de líquidos iónicos se ha descrito también para la microextracción en gota (SDME) [104] y la microextracción usando fibras huecas (HF-LPME) [105]. Se trata de disolventes no moleculares formados por sales orgánicas que son líquidas a temperatura ambiente. La mayoría tiene una estructura compuesta por cationes orgánicos grandes y asimétricos y aniones que pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica. Poseen propiedades físico-químicas únicas como una densidad elevada, una baja volatilidad, una viscosidad variable, una gran estabilidad térmica y una amplia capacidad de solvatación, las cuales dependen de la naturaleza de sus componentes iónicos [106,107]. Así mismo, la amplia variedad de combinaciones que pueden hacerse entre cationes y aniones hace que los líquidos iónicos pueden adaptarse estructuralmente para que sean hidrófobos o hidrófilos según convenga, lo que los convierte en una interesante alternativa ecológica a los disolventes orgánicos que se usan como membrana líquida en LPME.

Desde la aparición de la SPME en 1990 hasta hoy, han ido surgiendo nuevas técnicas de microextracción cada cierto tiempo cuya finalidad es la de mejorar la eficacia de las ya existentes, superar alguna/s de su/s limitaciones y/o ampliar su rango de aplicación, lo que hace del desarrollo

de nuevos procedimientos de preparación de muestras una línea de investigación en constante evolución.

En 2005, D.W.M. Arrigan, et al. [108] proponen un enfoque diferente para la LLE clásica, la extracción líquido-líquido modulada electroquímicamente por iones (*electrochemically-modulated LLE*) en la que se aplican voltajes comprendidos entre ± 1 voltio para la extracción de especies iónicas. Los estudios descritos en este trabajo, sirvieron como punto de partida para el desarrollo de la extracción mediante electromembrana (EME), otra modalidad de microextracción en fase líquida (LPME) en la que se basa el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral y que ha despertado especial interés en la última década.

1.2. EXTRACCIÓN MEDIANTE ELECTROMEMBRANA (EME)

Con el fin de mejorar la velocidad de difusión de los compuestos a través de la SLM en HF-LPME, en 2006, S. Pedersen-Bjergaard y K.E. Rasmusen [109], desarrollaron una técnica de preparación de muestra completamente nueva denominada extracción mediante electromembrana (*electromembrane extraction, EME*) basada en la extracción de compuestos iónicos presentes en muestras acuosas. A menudo también se la denomina extracción electrocinética a través de membranas (*electrokinetic membrane extraction, EME*). Los sistemas de EME emplean una configuración similar a la de los sistemas de HF-LPME con una configuración en tres fases, a la que se incorporan dos electrodos de platino, uno en la fase donadora y otro en la fase aceptora, situada en el interior de la fibra hueca, y que van conectados a una fuente de voltaje externo.

El proceso de extracción, consiste en aplicar una diferencia de potencial entre ambos electrodos de forma que los analitos cargados, migran desde la fase donadora hasta la fase aceptora a través de un disolvente orgánico inmiscible en agua inmovilizado en los poros de las paredes de una fibra hueca y que actúa como membrana líquida soportada. Una vez que los analitos, previamente ionizados, alcanzan la interfase entre la fase donadora y la SLM, entran en la fase orgánica en función de sus coeficientes de distribución ($\log P$) y del voltaje aplicado y, desde ahí, pasan a la fase aceptora tras atravesar la interfase entre ésta y la SLM [110]. Así pues, el principio de extracción mediante electromembrana se puede considerar como un híbrido entre la electroforesis y la HF-LPME en tres fases, donde la fuerza impulsora es la diferencia de potencial aplicado a través de la membrana líquida. De este modo, la transferencia de masa se produce como resultado de un mecanismo que combina la migración electrocinética de los analitos, facilitada por la acción del campo eléctrico que se genera al aplicar la diferencia de potencial, [1,111] junto con la difusión pasiva de los mismos a través de la SLM, que está determinada por sus correspondientes coeficientes de distribución [112-114].

Para que se dé una migración electrocinética eficiente, el pH debe ajustarse de forma que los analitos se encuentren completamente ionizados en ambas fases [115,116]. La extracción de analitos básicos (especies catiónicas), se lleva a cabo colocando el electrodo positivo en la fase donadora y el negativo en la fase aceptora, por lo que el pH debe tener un valor tal que asegure que los analitos se encuentran cargados positivamente [109,117,118]. Para analitos ácidos (especies aniónicas), la dirección del campo eléctrico se invierte, de forma que, en este caso, el

electrodo negativo se coloca en la fase donadora y el positivo en la aceptora y el pH debe controlarse para garantizar que los analitos adquieran carga negativa [109]. Así, en presencia de un campo eléctrico, los analitos cargados migran desde la fase donadora, donde se encuentra el electrodo con su misma carga, hacia el electrodo de carga opuesta situado en la fase aceptora, en la que quedan retenidos de forma efectiva debido a que su carga es opuesta a la del electrodo allí presente y a la propia dirección del campo eléctrico. La fase donadora se agita constantemente durante la extracción para garantizar la convección y la homogeneidad de la muestra durante todo el proceso (Figura 1.5) [119].

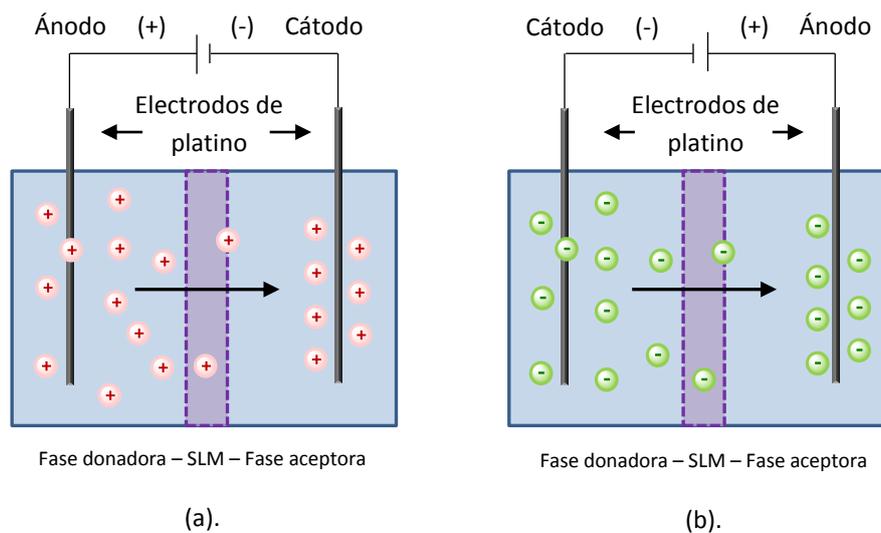


Figura 1.5. Esquema del procedimiento de extracción mediante electromembrana (EME) para la extracción de: (a). analitos catiónicos y (b). analitos aniónicos.

El gran interés científico que ha despertado la EME en los últimos años, está relacionado con varias características conceptuales únicas de la propia técnica que permiten controlar la selectividad de la extracción, principalmente, de tres formas:

a. Con la fuente de alimentación externa, modificando la dirección y la magnitud del campo eléctrico aplicado [120]. Por un lado, la dirección del campo eléctrico determina si se extraen cationes o aniones según la fase en la que se sitúen los electrodos del sistema, y, por otro lado, su magnitud determina el tipo de compuesto que se extrae [121]. A bajos voltajes, se extraen principalmente compuestos con una única carga y de naturaleza apolar. A medida que el voltaje aumenta, comienzan a extraerse las especies con más de una carga y las de naturaleza polar [122].

b. A partir de la composición química de la membrana líquida, ya que el disolvente orgánico que se emplea dependerá de la polaridad de los analitos de interés [109,123].

c. A partir del pH de la fase donadora y aceptora, cuyo valor dependerá de que se quieran extraer analitos de carácter ácido o básico [118].

Por otra parte, el uso de potenciales eléctricos aumenta la velocidad de la extracción, ya que el voltaje aplicado es una fuerza impulsora más fuerte para el movimiento de los analitos que un simple gradiente de pH, lo que proporciona una mayor velocidad de extracción en comparación con HF-LPME. Como resultado, se obtienen extracciones más rápidas que contribuyen a reducir los tiempos de análisis [117,124].

Al igual que en HF-LPME, se emplean fibras huecas de algún material poroso hidrófobo como soporte para la membrana líquida. Las que más se utilizan son las de polipropileno (PP), pues son compatibles con una amplia variedad de disolventes orgánicos y muy económicas lo que permite

desecharlas después de cada uso, evitando así fenómenos de *carry over*. Las dimensiones, el grosor y el tamaño de poro del soporte, determinan el volumen de disolvente orgánico necesario para formar la SLM que, normalmente, oscila entre 5 y 25 μl [113]. Los componentes de la matriz de la muestra (sales, proteínas y otras especies interferentes de alto y bajo peso molecular), se eliminan fácilmente gracias a la selectividad del campo eléctrico, a la naturaleza de la SLM y al tamaño de poro del soporte, que impiden el paso de los mismos a la fase aceptora. Por lo tanto, además de una extracción rápida, EME también proporciona muestras muy limpias a partir de matrices complejas. En determinados casos, la extracción mediante electromembrana resulta adecuada para el análisis de trazas pues el volumen de la fase aceptora, por lo general, es significativamente más bajo ($< 50 \mu\text{L}$) que el de la fase donadora, lo que permite la preconcentración de los analitos con elevados factores de enriquecimiento [117, 125-127]. Los analitos se extraen en una fase aceptora acuosa, por lo que la técnica es directamente compatible con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) y electroforesis capilar (CE) [125,126,128]. A todo esto, hay que sumar el empleo de bajos volúmenes de muestras que, junto con el uso de unidades de extracción desechables y de volúmenes mínimos de disolventes orgánicos ($< 30 \mu\text{L}$), reduce considerablemente los costes de operación así como el impacto ambiental de la técnica [125]. Por lo tanto, puede decirse que la extracción mediante electromembrana es una técnica simple que ofrece un enfoque dentro del marco de la “Química Verde” para la preparación de muestras analíticas [113,129].

Aunque la extracción mediante electromembrana se realiza fundamentalmente con una configuración en tres fases, también puede

darse en dos fases [128,130]. Para el análisis de la fase aceptora en este caso habría que emplear una técnica analítica compatible que permita la inyección de disolventes orgánicos, como la cromatografía de gases (GC).

1.2.1. Características cinéticas y modelos matemáticos

El uso de potenciales eléctricos para aumentar la velocidad de extracción, conlleva un mecanismo de migración electrocinética, de forma que el flujo de los analitos desde la fase donadora hasta la fase aceptora depende de varios factores o parámetros. En ese sentido, el flujo de los analitos a través de la membrana líquida en un proceso de EME, se ha descrito desde un punto de vista teórico mediante el empleo de un modelo matemático basado en la ecuación de Nernst-Planck [124]. Según el modelo, la transferencia de masa tiene un componente distributivo, gobernado por el coeficiente de distribución, y un componente electroforético, gobernado por el campo eléctrico [114].

Suponiendo que la membrana líquida es un fluido libre de convección en presencia de un campo eléctrico, el flujo de una especie iónica a través de la misma en un sistema en estado estacionario se puede describir a partir de la ecuación de Nernst-Planck:

$$J_j = -D_j \frac{dc_j}{dx} + \frac{D_j z_j e E c_j}{kT} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Mediante una serie de cálculos que implican el uso de la ecuación de Poisson, $\left(\frac{d^2 \phi}{dx^2} = \frac{\rho(x)}{\epsilon}\right)$ la aproximación de Planck (asumen que todos los puntos dentro de la membrana son eléctricamente neutros a escala

microscópica), la aproximación de Goldman (el campo eléctrico es constante en todos los puntos del sistema) y, asumiendo, que todas las especies que forman parte del sistema están ionizadas con una sola carga y que la SLM permanece neutra, el flujo de especies cargadas, J_i , a través de la membrana se puede calcular como:

$$J_i = -\frac{D_i}{h} \left(1 + \frac{v}{\ln \chi}\right) \left(\frac{\chi - 1}{\chi - \exp(-v)}\right) (c_i - c_{i0} \exp(-v)) \quad (\text{Ecuación 2})$$

dónde:

D_i es el coeficiente de difusión para el ion i (definido en la ecuación 3)

h es el espesor de la membrana

v es un coeficiente adimensional que expresa la fuerza del campo eléctrico (definido en la ecuación 4)

χ es el balance iónico y expresa la relación entre la concentración iónica total en la fase donadora y la fase aceptora

c_i es la concentración de analito en la interfase entre la fase donadora y la SLM

c_{i0} es la concentración de analito en la interfase entre la SLM y la fase aceptora.

$$D_i = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (\text{Ecuación 3})$$

dónde:

k es la constante de Boltzmann

T es la temperatura absoluta

η es la viscosidad del disolvente orgánico

r es el radio del analito

$$v = \frac{z_i e \Delta \phi}{kT} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

dónde:

z_i es la carga del analito

e es la carga eléctrica elemental

$\Delta \phi$ es la diferencia de potencial a través de la SLM

k es la constante de Boltzmann

T es la temperatura absoluta

De las ecuaciones 2 y 3 se deduce que el disolvente orgánico juega un papel muy importante en el transporte de materia, ya que influye en el coeficiente de distribución a través de la viscosidad, η , y controla la magnitud del campo eléctrico mediante el espesor, h , de la membrana líquida que forma. De este modo, el flujo de iones de una fase a otra será inversamente proporcional a la viscosidad del disolvente y al espesor de la membrana líquida que forma. Por lo tanto, cuanto menor sea la viscosidad y el espesor de la SLM, mayor será la migración electrocinética, y viceversa [131,132]. Por otra parte, en un sistema de EME dónde el coeficiente de difusión, D_i , y el espesor de la membrana, h , son constantes, el flujo de los analitos cargados a través de la SLM, J_i , depende de la temperatura, T , de la diferencia de potencial suministrado, $\Delta \phi$, y del balance iónico, χ . Este último, a su vez, depende del pH de ambas fases y del voltaje aplicado [119,124,132]. Así pues, cuanto mayores sean el voltaje y la temperatura y

menor el balance iónico, teóricamente, mejor será la eficacia de la extracción.

Aunque este modelo no lo contempla, el tiempo es otra variable experimental que influye considerablemente en la transferencia de masa.

Para evaluar la dependencia de la EME con tiempo de extracción, se propuso un modelo simple de transporte cinético a través de la membrana líquida basado en las siguientes suposiciones: (a). hay un tiempo de demora que depende del tiempo de residencia del analito en la SLM, (b). la etapa determinante de la velocidad de migración es el transporte a través de la SLM, (c). la convección en la fase donadora y en la fase aceptora es suficiente para que el paso de los analitos desde la primera a la segunda no limite la velocidad de migración y (d). el movimiento de los analitos es unidireccional[111,119].

En este modelo, la concentración del analito en función del tiempo, $C_A(t)$, se puede calcular según la ecuación:

$$C_{A_i}(t) = \frac{V_D C_{D_i}^0 - C_{D_i}^0 \cdot \exp\left(-\frac{A_i P_i^{D \rightarrow A}}{V_D} \cdot t\right) (V_D + K_d^0 \cdot V_m)}{V_A} \quad (\text{Ecuación 5})$$

dónde:

V_D es el volumen de la fase donadora

$C_{D_i}^0$ es la concentración inicial del analito en la fase donadora a tiempo cero ($t = 0$)

A_f es el área de superficie activa de la SLM

$P_i^{D \rightarrow A}$ es el coeficiente de permeabilidad de la SLM para el analito desde la fase donadora a la aceptora

V_m es el volumen de la SLM

V_A es el volumen de la fase aceptora

K_d^0 es el coeficiente de distribución

En la práctica, los modelos propuestos se basan en suposiciones que permiten simplificar las ecuaciones de modo que ninguno de ellos describe completamente la extracción electrocinética. A menudo, algunas de estas simplificaciones no son válidas desde el punto de vista experimental debido a que, con frecuencia, se producen desviaciones del modelo teórico, especialmente cuando los analitos tienen una gran afinidad por la SLM. Sin embargo, desde el punto de vista científico ambos modelos son de gran importancia, ya que las ecuaciones permiten conocer y comprender los principales parámetros operacionales que controlan la transferencia de masa en los procedimientos de extracción electrocinética [111,124].

Por lo tanto, las investigaciones anteriores demuestran que para desarrollar un procedimiento de extracción mediante electromembrana selectivo, reproducible, eficaz y robusto se han de optimizar una serie de parámetros operacionales que incluyen: el disolvente orgánico que se utiliza como membrana líquida soportada, el pH de las fases donadora y aceptora, el voltaje aplicado, el tiempo que dura la extracción, la agitación y la temperatura [133-135].

1.2.2. Parámetros operacionales que influyen en el procedimiento de EME

1.2.2.1. Membrana líquida soportada (SLM)

Un aspecto fundamental para que un procedimiento de extracción mediante electromembrana tenga éxito, es que el sistema sea lo más estable posible. Dicha estabilidad, viene determinada por la corriente eléctrica que se genera al aplicar la diferencia de potencial la cual, a su vez, depende del disolvente orgánico que se emplea como SLM, de la composición de las disoluciones donadora y aceptora y, en gran medida, del voltaje aplicado [136]. Como las dos disoluciones, normalmente, presentan una conductividad elevada, en unas condiciones fijas de voltaje, la corriente del sistema va a depender principalmente de la naturaleza de la membrana líquida. Esto último, está directamente relacionado con las propiedades del disolvente orgánico. Así pues, la elección del disolvente orgánico más adecuado es una de las etapas más importantes en EME, ya que la composición química de la SLM determina en gran medida la eficacia y la selectividad de la extracción [115].

El disolvente orgánico ideal para formar la SLM debe cumplir una serie de requisitos, tales como [131]:

- a. Tener una solubilidad muy baja o nula en agua, así como una polaridad similar a la del soporte poroso para que impregne bien y quede fijo en las paredes de éste, de forma que no se pierda por disolución en las fases acuosas durante la agitación.

b. Ser líquido a temperatura ambiente y tener una baja volatilidad o presión de vapor para minimizar las pérdidas por evaporación y mantener la estabilidad de la SLM durante la extracción.

c. Tener una baja viscosidad, para facilitar una rápida transferencia de masa de los analitos a la fase aceptora a través de la SLM. Según el modelo matemático anteriormente descrito, la viscosidad, η , es inversamente proporcional al coeficiente de difusión, D_i , de modo que cuanto menor sea la viscosidad mayor será la permeabilidad de la membrana y viceversa.

d. Tener un cierto momento dipolar o una baja conductividad eléctrica, pero no nula. En EME, las dos fases acuosas y la SLM deben completar un circuito eléctrico, por lo que es necesario que esta última tenga una resistencia eléctrica tal que permita la migración de los compuestos sin que se produzca un exceso de corriente en el sistema. Al aplicar una diferencia de potencial, se forma una doble capa eléctrica alrededor de la SLM al comienzo de la extracción como resultado del movimiento de los iones a ambos lados de la misma (Figura 1.6). La formación de esta doble capa, es crucial para que se dé la migración electrocinética por lo que sólo los disolventes con una cierta conductividad serán capaces de ello [123,126,136].

e. Tener una pureza lo mayor posible para evitar la contaminación de la fase aceptora.

f. Ser capaz de establecer interacciones moleculares con los compuestos, como interacciones dipolo-dipolo o interacciones por puentes

de hidrógeno, que contribuyan al transporte de los mismos de una fase a otra.

g. Ser poco o nada tóxico.

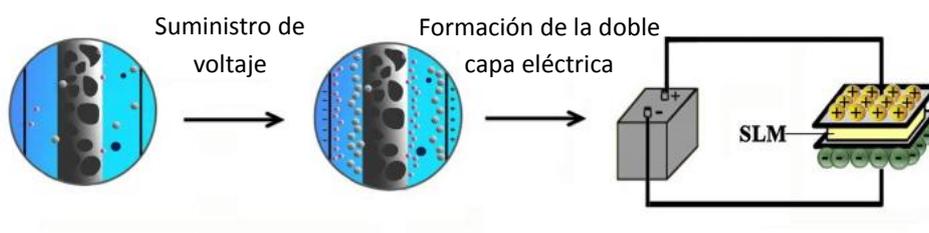


Figura 1.6. Formación de la doble capa eléctrica alrededor de la SLM al aplicar una diferencia de potencial [126].

Por otra parte, los analitos cargados han de ser lo suficientemente solubles en la membrana líquida como para poder ser transportados a través de la misma. Esto implica, que la elección del disolvente orgánico va a depender también de la naturaleza de los compuestos que se quieran extraer. En este caso, las características del disolvente más apropiado se estudian en función de sus parámetros solvatocrómicos de Kamlet y Taft: la acidez de enlace de hidrógeno (*hydrogen bonding acidity*, α), la basicidad de enlace de hidrógeno (*hydrogen bonding basicity*, β) y la dipolaridad/polarizabilidad (*dipolarity-polarizability*, π^*) [114,137,138].

Según lo descrito anteriormente, el disolvente orgánico debe ser optimizado para cada aplicación [112]. Así, los analitos no polares ($\log P > 2,5$) se pueden extraer mediante SLMs relativamente no polares [122]. Para los de carácter ácido, se requieren disolventes con valores altos para α , bajos para β y elevados o moderados para π^* [131]. En ese sentido, los

alcoholes alifáticos de cadena larga como el 1-octanol o el 1-nonanol suelen ser los disolventes orgánicos más apropiados para este tipo de compuestos [112,139]. Por el contrario, para los de carácter básico, los disolventes con valores bajos de α y altos para β y π^* son los más adecuados para su uso en EME [114,129]. En este caso, los disolventes nitroaromáticos como el 1-etil 2-nitrobenceno (ENB), el 1-isopropil-4-nitrobenceno (IPNB), el 2-nitrofenil pentil éter (NPPE) y, sobretodo, el 2-nitrofenil octil éter (NPOE) son los más empleados [112,114,115]. Por su parte, la extracción mediante electromembrana de analitos polares ($\log P < 2,5$), es más complicada debido a que su elevada polaridad contrarresta la acción del campo eléctrico y atraviesan la SLM con dificultad. Para facilitar el transporte de este tipo de compuestos, se añaden *carriers* o transportadores al disolvente orgánico [110]. Como ya se comentó anteriormente en el apartado 1.1.2, estos compuestos, interaccionan con los analitos polares mediante la formación de pares iónicos, lo que contribuye a aumentar la solubilidad y el paso de los mismos a través de la membrana líquida [135]. De este modo, para la extracción de analitos ácidos el *carrier* más empleado es el Aliquat®336 [140-142] mientras que para la extracción de analitos básicos se emplean el ácido di (2-etilhexil) fosfórico (D2EHPA) y el tris-(2-etilhexil) fosfato (TEHP) [119]

Recientemente, se han publicado algunos estudios en los que se emplean líquidos iónicos (*ionic liquids electromembrane extraction, IL-EME*) para la extracción electrocinética de compuestos polares y de polaridad moderada tanto de carácter ácido como básico [143-145]. Puesto que los líquidos iónicos tienen afinidad por los compuestos polares, el uso de éstos como membrana líquida aporta ventajas adicionales, ya que permiten obtener buenos resultados a bajos voltajes (entre 1,5 y 7,5 voltios) y son

menos tóxicos y volátiles que los disolventes orgánicos clásicos. Así pues, los líquidos iónicos, pueden ser una buena alternativa para la extracción de compuestos polares [115].

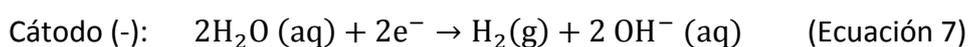
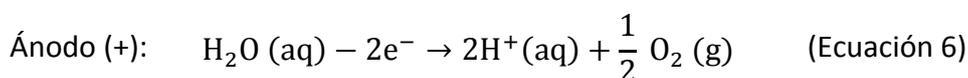
1.2.2.2. pH de las fases donadora y aceptora

La composición de las fases donadora y aceptora juega un papel esencial en los procedimientos de extracción electrocinética, ya que la transferencia de masa a través de la SLM se ve afectada por el balance iónico, χ , el cual, a su vez, depende del pH de cada una de ellas [110]. Por lo tanto, ambas disoluciones deben tener un valor de pH tal que garantice que los analitos se encuentren en su forma iónica, condición necesaria para que ocurra la migración de los mismos en presencia de un campo eléctrico [146].

Para la extracción de analitos básicos, se requiere un pH ácido que asegure que los compuestos estén protonados de forma que, al estar cargados positivamente, migren hacia el electrodo negativo inmerso en la fase aceptora. Por el contrario, la extracción de analitos ácidos implica un pH básico, de manera que los compuestos se desprotonen, adquieran carga negativa y migren hacia el electrodo positivo presente en la fase aceptora. Para asegurar la ionización completa de éstos, se adopta, como norma general, que el pH de la fase donadora ha de tener un valor de, al menos, dos unidades por encima o por debajo del pKa de los analitos según sean ácidos o básicos, respectivamente [147]. Por su parte, el pH de la fase aceptora debe ser o fuertemente ácido, si el analito es básico, o fuertemente básico, si el analito es ácido, pues esto favorece el paso de los mismos desde la interfase entre la SLM y la fase aceptora hacia ésta última

a la vez que evita que vuelvan a la fase donadora [135,146]. No obstante, se han publicado trabajos en los que se extraen tanto compuestos ácidos como básicos, a su correspondiente fase aceptora básica o ácida, desde una fase donadora en la que el pH del medio tiene un valor muy próximo a sus respectivos pKa. [117,125,140,148]. Esto último, parece indicar que el valor de pH en la fase donadora no es tan crítico como el de la fase aceptora.

Los ajustes de pH se realizan, generalmente, mediante la adición de ácidos minerales fuertes, como el ácido clorhídrico, HCl, o hidróxidos alcalinos, como el hidróxido de sodio, NaOH [149]. Sin embargo, en ocasiones y como consecuencia de la diferencia de potencial aplicado entre los electrodos que forman parte del sistema, se produce la electrolisis del agua según las siguientes ecuaciones:



Este hecho, parece indicar que pueden producirse cambios de pH tanto en la fase donadora como en la fase aceptora durante la extracción, disminuyendo su valor en el ánodo y aumentando en el cátodo. Ambas reacciones, son inherentes al propio procedimiento de EME y no se pueden eliminar. Sin embargo, cuando la concentración de los subproductos electrolíticos (iones H^+ y OH^-) es demasiado elevada, se producen cambios drásticos de pH en ambas disoluciones. Para contrarrestar o minimizar lo máximo posible este efecto, se podría aumentar la concentración del ácido o de la base pero existen algunas limitaciones en el uso de ácidos y bases

fuertes para ajustar el pH de las disoluciones donadora y aceptora, ya que una concentración elevada de éstos conduce a un aumento del número de iones que migran a través de la membrana líquida y, por lo tanto, de la corriente del sistema [133,139,149]. Si la corriente supera determinados valores, las reacciones de electrolisis se multiplican, lo que afecta negativamente a la eficacia de la extracción, puesto que se pierde la estabilidad del sistema [150].

Las variaciones de pH son más evidentes en la fase aceptora, cuyo volumen es del orden de los microlitros, tres órdenes de magnitud más bajo en comparación con los volúmenes de fase donadora (del orden de los mililitros) que se utilizan de forma habitual. Si el pH de la fase aceptora cambia bruscamente durante la extracción, algunos de los analitos transferidos pueden perder su carga en función de cual sea su valor de pKa. Al estar en forma neutra, vuelven a la SLM y/o a la fase donadora por difusión debido a que dejan de interaccionar con el campo eléctrico, que es la fuerza que los impulsa y mantiene en la fase aceptora. Como resultado, su concentración en ésta disminuye y se obtienen bajas recuperaciones [149,151]. Por el contrario, los cambios de pH en la fase donadora, además de ser menos pronunciados, son menos críticos pudiendo, en determinadas ocasiones, influir de manera positiva en el rendimiento de la extracción. En el caso de los analitos ácidos, la electrolisis, en condiciones normales, provoca un ligero aumento del pH de la fase donadora, lo cual puede ser favorable teniendo en cuenta que hay que alcalinizar el medio para que estos compuestos se ionicen. Este mismo razonamiento, pero al contrario, se aplica a los analitos básicos [139]. Este comportamiento revela que el pH de la fase aceptora juega un rol más importante en la eficacia de la extracción que el de la fase donadora. Así pues, el pH de

ambas disoluciones, especialmente el de la fase aceptora, debe optimizarse cuidadosamente para evitar cambios bruscos debidos a las reacciones de electrolisis [129].

La aparición de electrolisis durante la EME, se ha demostrado y visualizado experimentalmente utilizando disoluciones acuosas que contienen indicadores ácido-base en sistemas que emplean membranas líquidas libres (*FLM-EME*) (Figura 1.7) [152], los cuales se describen con más detalle en el apartado 1.2.4.2.

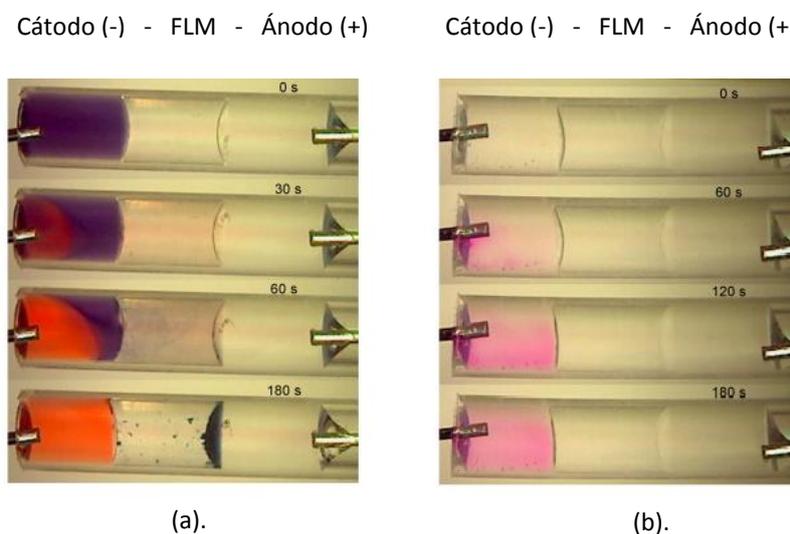


Figura 1.7. Estudio del efecto de la electrolisis en EME en presencia de indicadores ácido-base. (a). Rojo congo. (b). Fenolftaleína. [152]

Para evitar o reducir los efectos negativos de la electrolisis y conseguir buenos rendimientos de extracción, se podría aumentar el volumen de la fase aceptora, aunque una consecuencia directa de este aumento es la disminución de los factores de enriquecimiento. Una solución más adecuada y que cada vez tiene más aceptación, es el uso de tampones para ajustar el pH de las fases donadora y aceptora [119, 151].

1.2.2.3. Voltaje aplicado

El voltaje de extracción, es la variable experimental que más influye en la transferencia de masa a través de la membrana líquida soportada en los procedimientos de EME. Esta transferencia de masa depende, en mayor medida, del campo eléctrico que se genera al aplicar una diferencia de potencial entre los electrodos, cuya intensidad depende, a su vez, del voltaje suministrado. [153-155]. Así pues, el transporte de materia, necesariamente, va a estar directamente relacionado con la magnitud del voltaje aplicado, tal y como predice el modelo matemático anteriormente descrito. Se espera entonces que, al aumentar el voltaje también lo haga la eficacia de la extracción puesto que voltajes altos favorecen el flujo de analitos a través de la SLM [146].

Ahora bien, si se supone que la resistencia del sistema al paso de la corriente es constante, mediante la ley de Ohm [156] se puede demostrar que cuando el voltaje aumenta también lo hace la intensidad de corriente, comportamiento que impide aumentar el voltaje por encima de un determinado nivel. A voltajes elevados, la corriente que se genera es tan alta que puede ocasionar problemas como calentamientos por efecto Joule que provoquen perforaciones en el soporte y/o la pérdida de la SLM por evaporación así como una fuerte electrolisis, con el consiguiente cambio brusco de pH en ambas fases, la retro-difusión de los analitos a la fase donadora y la formación de burbujas [126,151,157,158]. Como resultado, el sistema pierde estabilidad, lo cual afecta a la reproducibilidad de los resultados, a la selectividad y a la eficacia de la extracción. De este modo, el rango de voltaje que se puede emplear dependerá de la naturaleza y, principalmente, de la resistencia eléctrica de la membrana líquida

[116,131]. Para algunos disolventes orgánicos típicos, como los alcoholes de cadena larga, el voltaje aplicado se limita a 100 V, mientras que otros como el NPOE pueden tolerar hasta 300 V [126]. Por otra parte, la corriente que se produce se puede reducir aumentando el volumen de la membrana líquida. Sin embargo, una membrana más gruesa conlleva un aumento en la trayectoria de difusión lo que, en teoría, reduce la eficacia del proceso [132].

Por lo tanto, el voltaje de extracción, al ser la principal fuerza impulsora en los procedimientos de EME, es un parámetro operacional clave y como tal ha de optimizarse cuidadosamente de forma que se obtenga el mayor rendimiento de extracción posible sin poner en juego la integridad y la estabilidad del sistema.

1.2.2.4. Tiempo de extracción

El tiempo de extracción es, junto con el voltaje aplicado, otro parámetro decisivo que influye directamente en el flujo de analitos a través de la SLM. Determina el total de iones transferidos desde la fase donadora a la fase aceptora y está estrechamente relacionado con la naturaleza del analito a extraer y con los parámetros operacionales anteriormente descritos [116,153,156].

En general, la eficacia de la extracción aumenta en función del tiempo hasta un cierto punto en el que el sistema alcanza el estado estacionario, momento en el cual la extracción se da por finalizada dado que la recuperación alcanza el máximo valor posible [115]. Por consiguiente, tanto el tiempo como el voltaje son dos parámetros que

operan en paralelo puesto que favorecen el transporte de materia y, por lo tanto, contribuyen a aumentar la eficacia de la extracción. Pese a ello, existe un efecto antagónico cuando ambos parámetros se consideran de forma simultánea ya que un aumento en el tiempo de extracción limita el voltaje que se puede aplicar y viceversa [134].

Así pues, al igual que el voltaje, el tiempo debe optimizarse cuidadosamente durante el desarrollo del método de extracción, pues cuando el sistema opera durante largos periodos de tiempo la eficacia de la extracción puede disminuir debido a problemas de inestabilidad relacionados con una electrolisis excesiva y la disminución de la resistencia de la membrana líquida al paso de la corriente eléctrica [159].

1.2.2.5. Agitación

La agitación de la muestra es esencial en la mayoría de las técnicas de extracción electrocinética puesto que asegura la homogeneidad del medio de extracción. En general, un aumento de la velocidad de agitación favorece la cinética y mejora la eficacia de la extracción al aumentar la transferencia de masa y reducir el espesor de la doble capa eléctrica que se forma alrededor de la SLM [128,135,153]. El valor de la velocidad de agitación varía según el sistema en el que se realiza la extracción y la configuración empleada y suele estar comprendido entre 0 y 1250 rpm. A mayores velocidades de agitación, la eficacia de la extracción decae como consecuencia de la pérdida del disolvente orgánico inmovilizado en las paredes del soporte poroso y la formación de vórtices y burbujas en la fase donadora, lo que conduce a resultados poco fiables y nada reproducibles [110].

1.2.2.6. *Temperatura*

La temperatura es otro factor que puede afectar al flujo de iones a través de la membrana líquida soportada. En teoría, un aumento de la temperatura disminuye la viscosidad del disolvente orgánico, lo que se traduce en un aumento del coeficiente de difusión, D_i , y por lo tanto, del flujo de analitos a través de la SLM, J_i . Experimentalmente, se ha demostrado que al aumentar la temperatura del sistema de 10 a 40°C aumenta la eficacia de la extracción [124]. Sin embargo, no se recomienda trabajar a temperaturas superiores a la temperatura ambiente porque las temperaturas elevadas comprometen la estabilidad de la SLM y la de todo el sistema en general. Además, el control de la temperatura a menudo es difícil y puede ocasionar problemas de reproducibilidad [134]. Por esta razón, se ha prestado poca atención a la temperatura como parámetro operacional en EME y la mayoría de las aplicaciones se realizan a temperatura ambiente.

1.2.3. **Evaluación de la eficacia de la extracción**

La eficacia del proceso de extracción se puede expresar de dos formas, bien en términos de enriquecimiento o bien en términos de porcentaje de recuperación. Para ello, se ha de tener en cuenta la concentración de analito presente en la fase aceptora una vez finalizada la extracción.

1.2.3.1. *Factor de enriquecimiento*

El factor de enriquecimiento (*enrichment factor, EF*) para cada analito i , se define como la relación entre la concentración final de analito en la

fase aceptora respecto de la concentración inicial de analito en la fase donadora, y se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$EF_i = \frac{C_{f,a}}{C_{i,s}} = \frac{V_s}{V_a} \cdot R(\%) \quad (\text{Ecuación 8})$$

dónde:

$C_{f,a}$ es la concentración final de analito en la fase aceptora

$C_{i,s}$ es la concentración inicial de analito en la fase donadora

V_s es el volumen de la fase donadora

V_a es el volumen de la fase aceptora

$R(\%)$ es el porcentaje de recuperación

1.2.3.2. Porcentaje de recuperación

El porcentaje de recuperación ($\%R$) para cada analito i , se define como la fracción de analito i presente en la muestra que es transferida a la fase aceptora y se calcula según la ecuación:

$$R(\%)_i = \frac{n_{f,a}}{n_{i,d}} \cdot 100 = \frac{V_a}{V_s} \cdot \frac{C_{f,a}}{C_{i,d}} \cdot 100 = EF \frac{V_a}{V_s} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 9})$$

dónde:

$n_{f,a}$ son los moles de analito transferidos a la fase aceptora

$n_{i,s}$ son los moles de analito presentes inicialmente en la fase donadora

V_s es el volumen de la fase donadora

V_a es el volumen de la fase aceptora

$C_{f,a}$ es la concentración final de analito en la fase aceptora

$C_{i,s}$ es la concentración inicial de analito en la fase donadora

De las ecuaciones 8 y 9 se deduce que, para una misma concentración inicial de analito en la fase donadora, la eficacia de la extracción será mayor cuanto mayor sea la concentración final del analito en la fase aceptora, y viceversa. Esto es lógico, pues una mayor concentración en la fase aceptora implica una mayor transferencia de masa.

1.2.4. Modos de operación en EME

Durante la última década, se han desarrollado varias modalidades de EME para mejorar los enriquecimientos, las recuperaciones y/o los rendimientos de extracción. Estos formatos, pueden agruparse en dos grandes categorías dependiendo de cómo se coloque la capa de disolvente orgánico que separa las fases donadora y aceptora (Figura 1.8).

La primera categoría, incluye dispositivos en los que se emplean membranas líquidas soportadas, ya que el disolvente orgánico se inmoviliza en la superficie porosa de algún tipo de soporte polimérico. La segunda categoría, engloba a todos aquellos dispositivos en los que no se utiliza ningún tipo de soporte físico para el disolvente orgánico, que en estos casos recibe el nombre de membrana líquida libre (*free liquid membrane, FLM*) [113].

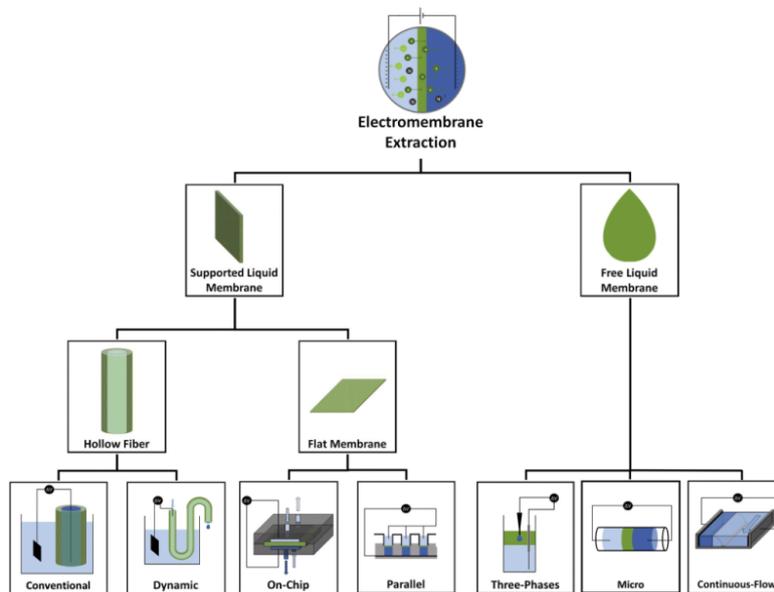


Figura 1.8. Clasificación de las modalidades de EME [113].

1.2.4.1. Dispositivos que emplean membranas líquidas soportadas

Desde el punto de vista instrumental, la extracción mediante electromembrana está considerada como una forma evolucionada de la HF-LPME. Por lo tanto, la mayoría de los dispositivos de EME empleados hasta la fecha utilizan fibras huecas porosas de algún material polimérico, principalmente polipropileno, como soporte para la membrana líquida y operan según el procedimiento de extracción anteriormente descrito [129].

Además de la configuración tradicional, en la que se utiliza una única fibra situada en uno de los electrodos para la extracción de los compuestos de interés, se han propuesto otras configuraciones diferentes que implican el uso de múltiples fibras huecas. Estas configuraciones alternativas, se han empleado para llevar a cabo tanto la extracción exhaustiva de los analitos [132] como para la extracción simultánea de analitos de distinta

naturaleza, como compuestos ácidos y básicos [134,153,160], compuestos de distinta polaridad [161] e iones metálicos con diferente estado de oxidación [162].

En 2012, L.E.E. Eibak et al. [132], describieron el uso de tres fibras huecas inmersas de forma simultánea en la fase donadora, para la extracción exhaustiva de seis fármacos básicos polares presentes en muestras de plasma humano. La finalidad de esta configuración, era lograr la extracción completa de los compuestos de interés mediante el aumento del área superficial de la SLM, parámetro que influye en el rendimiento de la extracción. Mediante este sistema, se obtuvo una alta eficacia de extracción, con recuperaciones entre el 97 y el 115%. Sin embargo, la manipulación de una configuración como ésta era bastante compleja, ya que requiere el uso de cuatro electrodos que han de introducirse al mismo tiempo en el compartimento empleado para colocar la fase donadora, cuyo espacio interior, a menudo, suele ser bastante reducido (Figura 1.9).

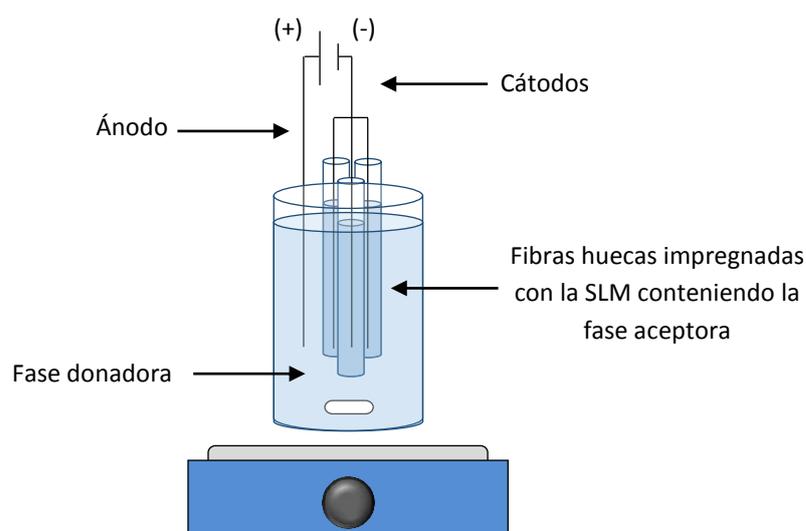


Figura 1.9. Dispositivo para la EME exhaustiva empleando tres fibras huecas.

Para la extracción simultánea de compuestos con características diferentes, se desarrolló la extracción mediante electromembrana dual (*dual electromembrana extraction, DEME*), en la que dos fibras huecas, situadas cada una en un electrodo distinto, se sumergen a la vez en la misma disolución donadora.

H. Tabani et al. [160], utilizaron la primera configuración de este tipo para la extracción simultánea de compuestos ácidos (ibuprofeno) y básicos (tebaína) aplicando un voltaje constante (Figura 1.10). Para la extracción de los analitos ácidos, una de las fibras (fibra nº1) se impregnó con 1-octanol como SLM, se llenó con una disolución básica como fase aceptora y se colocó en el ánodo. Para la extracción de los analitos básicos, la segunda fibra (fibra nº2) se impregnó con NPOE como SLM, se llenó con una disolución ácida como fase aceptora y se colocó en el cátodo. La extracción se realizó al pH de la disolución donadora y se aplicó con éxito para el análisis de muestras de plasma y orina con factores de enriquecimiento comprendidos entre 150 y 170.

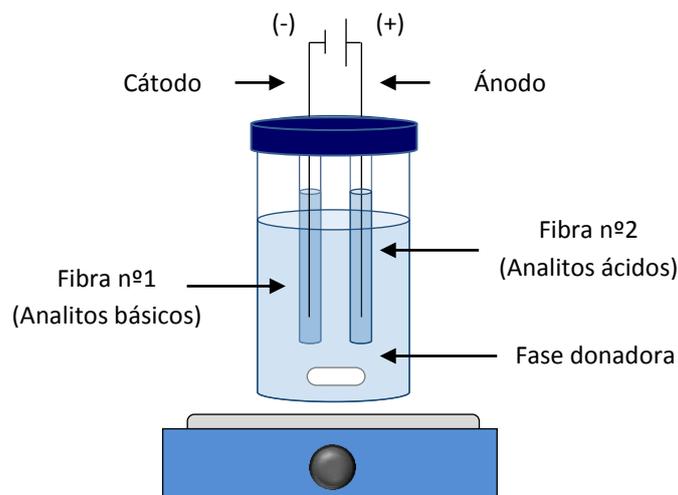


Figura 1.10. Dispositivo para la EME simultánea de analitos ácidos y básicos.

Al mismo tiempo, S. Seidi et al. [134], aplicaron un enfoque similar para la extracción de diclofenaco (fármaco ácido) y nalmefeno (fármaco básico) en muestras de orina en condiciones de bajo voltaje.

Esta misma configuración se ha utilizado para la extracción simultánea de cromo en dos estados de oxidación diferentes, Cr (III) y Cr (VI), en muestras de agua utilizando 1-octanol como membrana líquida soportada [162].

Aunque la extracción simultánea de compuestos de distinta naturaleza presenta ventajas más que evidentes, en ocasiones resulta complicado encontrar un voltaje óptimo que permita obtener la máxima eficacia de extracción para cada uno de los analitos. Para solucionar este problema, S. Asadi y S. Nojavan [153], plantearon el uso de dos voltajes escalonados (uno bajo seguido de uno alto), en lugar de un voltaje constante, para mejorar el rendimiento de la extracción. Utilizando ibuprofeno y naproxeno como analitos ácidos y ketamina como analito básico, las recuperaciones mejoraron entre un 50 y un 100% respecto de las obtenidas a voltaje constante y en las mismas condiciones de extracción.

El mismo razonamiento se puede aplicar cuando se trata del pH de la fase donadora. Es decir, la dificultad de encontrar un valor de pH al que tanto analitos ácidos como básicos se encuentren ionizados, puede reducir la eficacia de la extracción respecto de la obtenida cuando los compuestos se extraen por separado a sus valores de pH óptimos. Para solventar este inconveniente, S. Nojavan y S. Asadi [163], desarrollaron una modalidad en tándem para la extracción simultánea de compuestos ácidos y básicos pero

en dos celdas separadas, conectadas entre sí mediante un puente metálico de cobre (Figura 1.11). En esta configuración, cada fibra se coloca en un electrodo y se sumergen por separado en dos viales que contienen la misma disolución pero a diferentes valores de pH. Por lo tanto, en vez de trabajar a un pH de fase donadora neutro, el pH de cada disolución se optimiza por separado de forma que, en cada caso, se trabaje al valor más adecuado según se quieran extraer compuestos ácidos o básicos. Este procedimiento, se aplicó al análisis de naproxeno, ibuprofeno (fármacos ácidos) y ketamina (fármaco básico) en muestras de aguas residuales y orina humana utilizando 1-octanol y 2-etil hexanol como SLM, respectivamente.

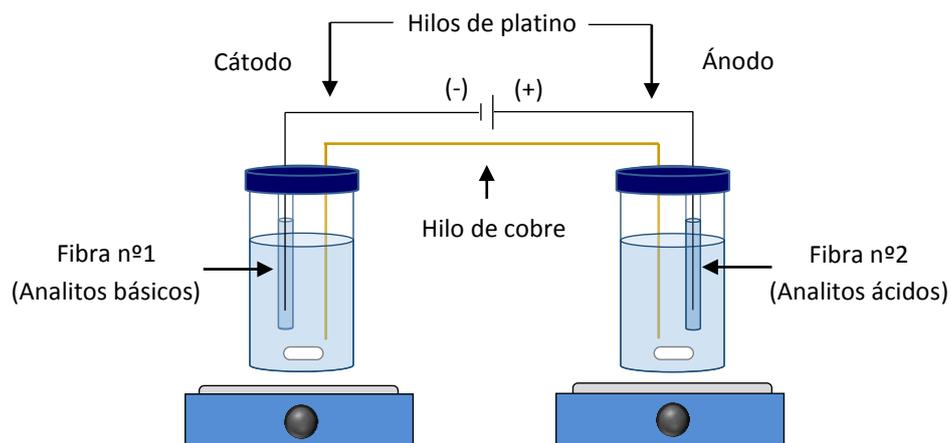


Figura 1.11. Dispositivo para la EME simultánea de analitos ácidos y básicos formado por dos celdas separadas para la fase donadora.

Alternativamente, se implementó un concepto similar de extracción dual para la extracción simultánea de fármacos básicos de distinta polaridad. Utilizando atenolol (fármaco polar) y betaxolol (fármaco no polar) como analitos modelo, L. Arjomandi-Behzad et al. [161], emplearon un sistema modificado formado por tres electrodos: dos cátodos y un

ánodo (Figura 1,12). El atenolol, se extrajo en una fibra hueca impregnada con NPOE como membrana líquida, mientras que la fibra en la que se extrajo el betaxolol se impregnó con una mezcla NPOE + DEHP (90:10, v/v). Ambas fibras, se llenaron con una disolución ácida como fase aceptora y se colocaron por separado en cada uno de los cátodos. La extracción se realizó al pH de la disolución donadora y se aplicó en muestras de plasma y orina.

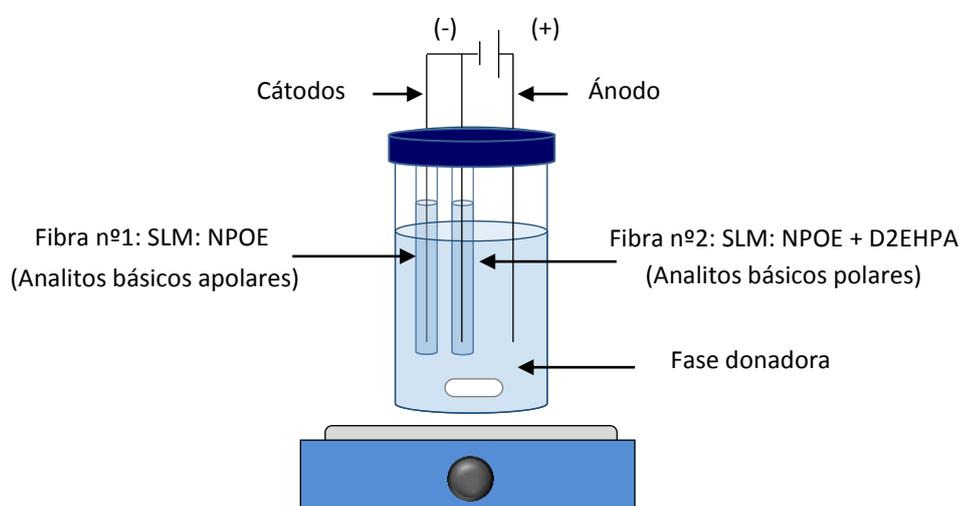


Figura 1.12. Dispositivo para la EME simultánea de analitos básicos de distinta polaridad.

El éxito del procedimiento anterior, llevó al desarrollo de una variante “todo en uno” que permitía extraer compuestos ácidos y básicos con un amplio rango de polaridades [164]. El sistema consta de cuatro electrodos, dos cátodos y dos ánodos, e implica el uso simultáneo de cuatro fibras huecas impregnadas con disolventes orgánicos de distinta polaridad y situadas cada una de ellas en un electrodo diferente (Figura 1.13). De este modo, los analitos ácidos (aniónicos) se extraen en las fibras colocadas en los ánodos y los básicos (catiónicos) lo hacen en las que se encuentran en los cátodos. El que cada compuesto migre hacia una u otra

fibra, depende de su propia polaridad y de la polaridad de la SLM que recubra la fibra. El procedimiento se probó para el análisis de muestras de orina, obteniéndose buenos resultados en términos de recuperación y enriquecimiento.

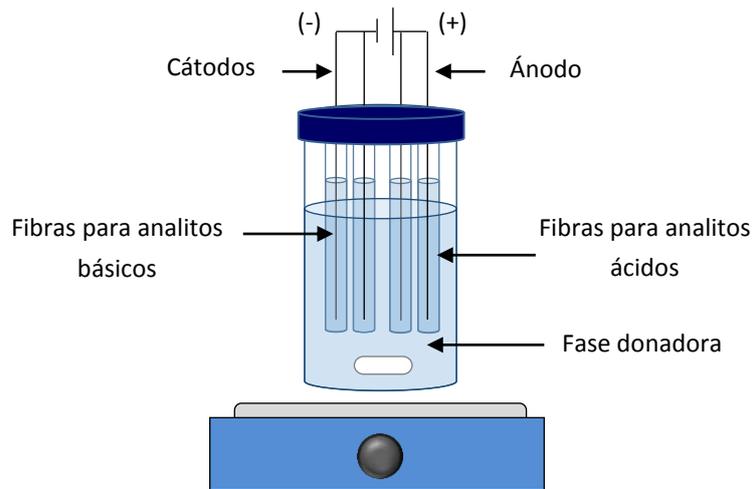


Figura 1.13. Dispositivo para la EME simultánea de analitos ácidos y básicos de distinta polaridad.

Se han descrito, también, sistemas que emplean fibras huecas como soporte para la membrana líquida en los que la fase donadora y aceptora se renuevan continuamente. Este concepto se conoce como extracción mediante electromembrana dinámica (*dynamic-EME, d-EME*) y se introdujo por primera vez en 2010 [91] utilizando dispositivos microfluídicos con membranas planas de polipropileno como soporte para la SLM. Por su parte, los sistemas dinámicos que emplean fibras huecas se describieron por primera vez en 2015 [165]. En ellos, una fibra hueca se impregna con la membrana líquida y se coloca en el interior de una celda de flujo conectándola por los extremos a dos tubos de plástico. Por el extremo inferior, se introduce uno de los electrodos y por el superior se suministra

la fase aceptora con la ayuda de una bomba de jeringa. La celda de flujo, en cuyo interior se encuentra el otro electrodo, se conecta a una bomba peristáltica que renueva continuamente la disolución que contiene los compuestos de interés (Figura 1.14). Esta configuración proporciona un método estable, eficaz y reproducible con el que se mejora considerablemente la eficacia de la extracción. Estos sistemas se han aplicado al análisis de compuestos básicos (amitriptilina y nortriptilina) en plasma y orina.

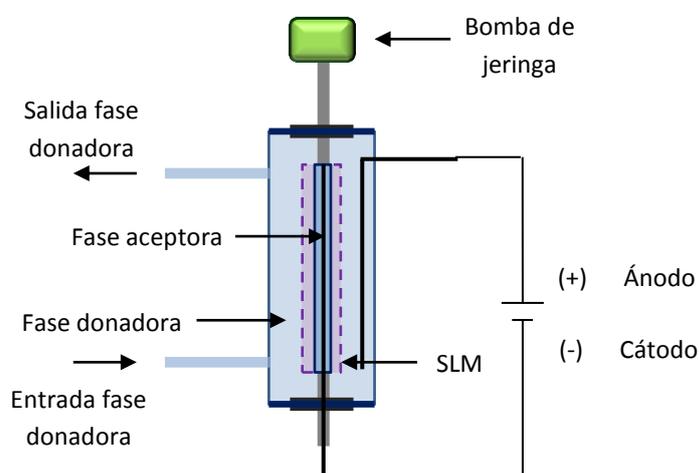


Figura 1.14. Esquema del dispositivo para la EME dinámica (*dynamic-EME, d-EME*) [165].

Un dispositivo similar a éste, se utilizó para el análisis de neuropéptidos, con la diferencia de que, en este caso, la que se renueva continuamente es la fase aceptora [166]. La renovación continua de dicha fase, minimizaba los problemas de cambio de pH relacionados con la electrolisis, al mismo tiempo que se evitaba la retro-difusión de los analitos a la fase donadora. Como resultado, se obtenían elevados factores de enriquecimiento y recuperaciones bastante buenas.

Las fibras huecas de polipropileno, también se han utilizado como soporte en sistemas que emplean capilares de sílice fundida como compartimento para la fase aceptora y que se acoplan directamente al sistema instrumental de análisis.

Partiendo de esta base, se diseñaron los sistemas nano-EME, formados por un capilar de sílice de electroforesis sobre el que se realiza una pequeña grieta que, seguidamente se cubre insertando una fibra hueca de 5 mm de longitud. Los extremos de la fibra, se sellan térmicamente para fijar la fibra al capilar y crear una conexión hermética, evitando así que la muestra entre al capilar sin pasar a través de la membrana líquida. La SLM se coloca sobre la fibra hueca y, a continuación, se sumerge en la fase donadora. El capilar, se conecta en un extremo al vial que contiene la fase aceptora y en el otro extremo al sistema de electroforesis capilar (Figura 1.15).

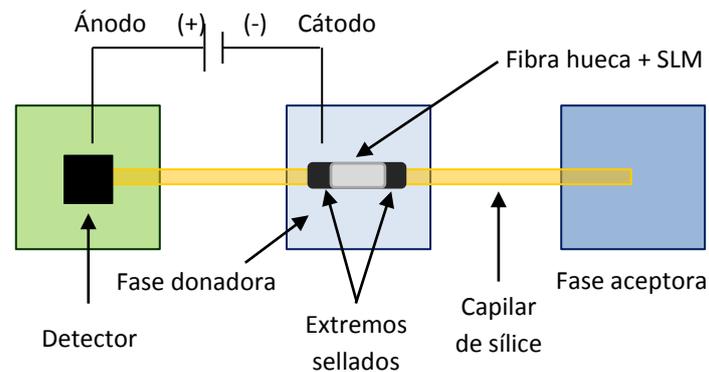


Figura 1.15. Dispositivo para la extracción mediante nano-electromembrana (nano-EME).

El concepto de nano-EME es similar al de EME convencional aunque el volumen de fase aceptora se reduce en un factor de 1000, a sólo 8

nanolitros, lo que permite obtener factores de enriquecimiento muy elevados. Además, la limpieza electro-asistida de la fibra permite la reutilización del capilar para más de 200 extracciones. Esta configuración se aplicó a la determinación de fármacos básicos (petidina, nortriptilina, metadona, haloperidol y loperamida) en muestras de orina [167].

Se han descrito también configuraciones similares a esta última, en las que la fase aceptora se hace pasar a través de una sonda capilar que emplea fibras huecas como soporte para la SLM. Según que operen en modo semi-dinámico o dinámico, se conocen los sistemas de medio flujo (*EME-probe*) [122] y los sistemas de doble flujo (*flow-flow EME*) [168]. En el primer caso, la fase aceptora se suministra continuamente al interior de una sonda sumergida en una fase donadora estática que se agita permanentemente durante todo el proceso mientras que, en el segundo caso, las fases donadora y aceptora se mantienen en continuo movimiento. Ambos dispositivos, se han utilizado para el análisis de fármacos básicos (amitriptilina, prometazina e imipramina) mediante espectrometría de masas acoplada a un sistema de ionización por electrospray (ESI-MS).

El empleo de fibras huecas como soporte para la membrana líquida, es el formato más extendido ya que proporciona un aislamiento rápido de los compuestos, extractos muy limpios y permite obtener elevados factores de enriquecimiento gracias a la elevada relación de volúmenes entre la fase donadora y aceptora. Sin embargo, el reducido volumen interno de la fibra es también su principal inconveniente ya que las variaciones de pH en la fase aceptora, debidas a las reacciones de electrolisis, son más acusadas cuanto menor es el volumen de la misma.

Alternativamente, se han desarrollado otros dispositivos y modos operacionales que emplean soportes planos para la SLM con el fin de minimizar algunos de los inconvenientes asociados al uso de fibras huecas.

La extracción mediante electromembrana usando láminas planas como soporte para la SLM se desarrolló por primera vez en 2008 para el análisis de productos de degradación de agentes nerviosos [169]. Los compuestos se extrajeron en un volumen de 20 microlitros usando 1-octanol como membrana líquida soportada. Como soporte, se empleó una lámina plana de polipropileno, cuyo espesor es mucho menor que el de cualquiera de las fibras que se emplean habitualmente. El dispositivo de extracción presenta una configuración tradicional en la que la fibra se sustituye por una especie de sobre formado por dos láminas planas superpuestas y cuyos bordes laterales e inferior se sellaron térmicamente para formar el compartimento en el que se sitúa la fase aceptora.

Posteriormente, C. Basheer et al. [170], emplearon un compartimento de fase aceptora similar al descrito anteriormente para la extracción simultánea de analitos ácidos y básicos. Dicho compartimento se fabricó utilizando cuatro láminas de polipropileno superpuestas cuyos bordes laterales e inferior se sellaron térmicamente, resultando un total de tres divisiones. Las divisiones laterales se llenaron con sendas disoluciones ácidas y básicas y se colocaron en el cátodo y en el ánodo para la extracción de los analitos básicos y ácidos, respectivamente (Figura 1.16). El compartimento central se llenó con la fase aceptora, 1-octanol, mientras que la superficie externa del soporte se impregnó con tolueno. Al aplicar una diferencia de potencial, los analitos migran desde una fase donadora

neutra hacia sus respectivos compartimentos en función de su naturaleza y, una vez allí, pasan al 1-octanol presente en el compartimento central.

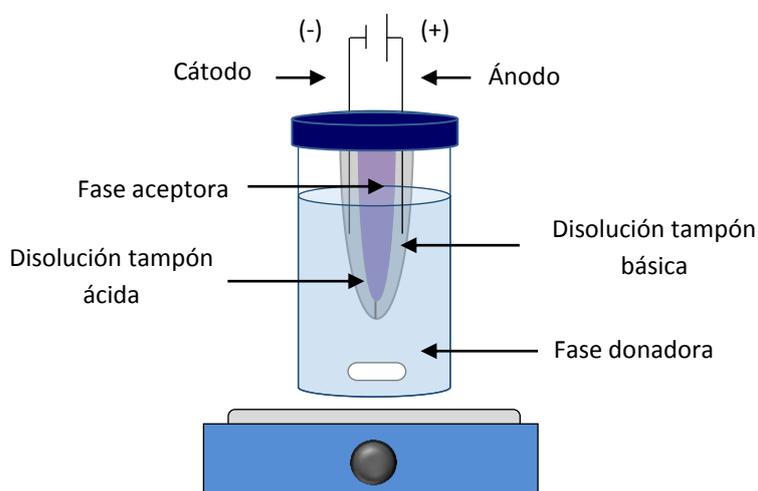


Figura 1.16. Dispositivo para la EME simultánea de analitos ácidos y básicos con láminas de polipropileno como soporte para la SLM.

Casi al mismo tiempo, en 2009, N.J. Petersen et al. [171], proponen por primera vez el uso de una versión miniaturizada de EME en condiciones estáticas en la que las láminas planas se utilizan como soporte en una configuración con geometría plana (Figura 1.17). La técnica, emplea un pequeño pozo de papel de aluminio como compartimento para la fase donadora sobre el que se coloca una lámina de polipropileno impregnada con la membrana líquida para, finalmente, colocar una pequeña gota de fase aceptora en la parte superior de la misma. El pozo de aluminio se conecta a una de las salidas de la fuente de voltaje de forma que todo el recipiente actúa como electrodo. El otro electrodo, se sumerge en la parte superior de la gota y, tras aplicar el voltaje adecuado, la gota se recoge a un vial para su posterior análisis. La extracción se realiza normalmente utilizando voltajes bajos e implica tiempos de extracción cortos. Esta

técnica se aplicó al análisis de cinco fármacos básicos (petidina, nortriptilina, metadona, haloperidol y loperamida) en muestras de plasma y orina humana obteniéndose porcentajes de recuperación comprendidos entre el 19 y 47%. Esta modalidad, se denominó extracción mediante electromembrana gota a gota (*drop-to drop EME*) y permitió, por primera vez, disminuir la escala de volúmenes en EME a unos pocos microlitros en ambas fases, favoreciendo así una rápida transferencia de masa sin necesidad de agitación. El fundamento teórico de esta técnica, sirvió como base para el posterior desarrollo de los procedimientos de EME en dispositivos microfluídicos.

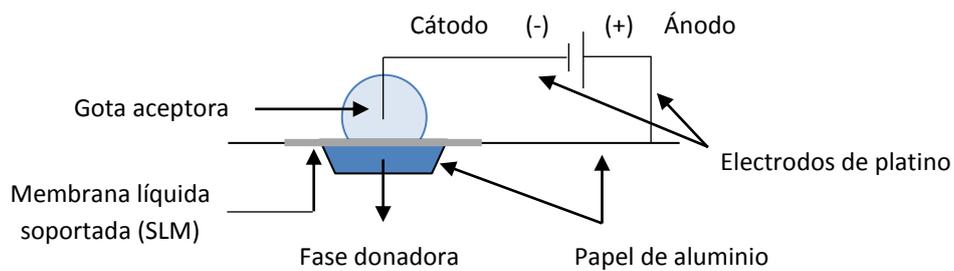


Figura 1.17. Dispositivo empleado para la extracción mediante electromembrana gota a gota (*drop to drop EME*) [171].

Así, en el año 2010, el mismo grupo de investigación propone, por primera vez, la aplicación de la extracción mediante electromembrana en dispositivos microfluídicos on-chip, dando lugar a lo que se conoce como *EME on-chip* [91].

La primera versión empleaba dispositivos semi-dinámicos en los que la fase donadora se mantenía en continuo movimiento, mientras que la fase aceptora permanecía estática (Figura 1.18). El dispositivo, fabricado en

polimetilmetacrilato (PMMA), está formado por dos placas diferentes. En una de ellas, se encuentran los canales por los que se hace pasar la fase donadora (6 mm x 2 mm x 50 μ m), mientras que en la otra placa contiene los compartimentos en los que se coloca la fase aceptora fija. Ambas placas, se separan mediante una lámina plana de polipropileno que actúa como soporte para la SLM. Para que se produzca la migración electrocinética, uno de los electrodos se coloca en el tubo de entrada de la fase donadora y el otro directamente en la fase aceptora. Al término de la extracción, la fase aceptora se recoge y se analiza [91].

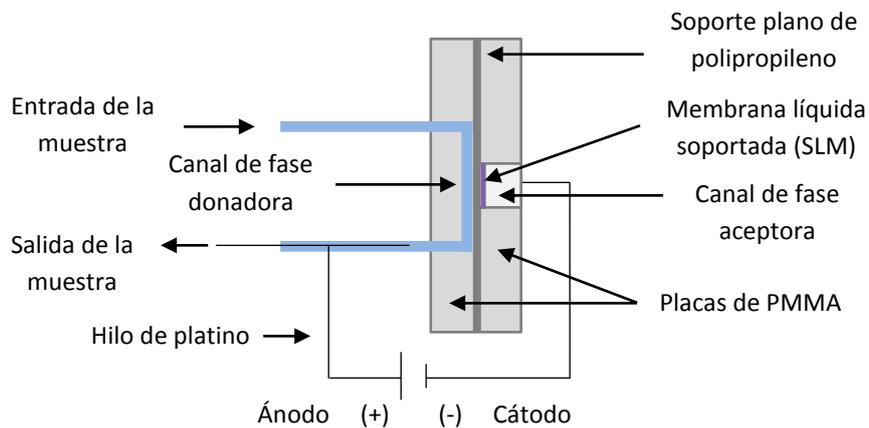


Figura 1.18. Dispositivo microfluídico *on-chip* semi-dinámico (fase donadora móvil, fase aceptora estática) [91].

Posteriormente, se desarrolló un sistema dinámico de flujo doble en el que las fases donadora y aceptora se bombean continuamente a través de los canales del chip (Figura 1.19) [89]. En este caso, el dispositivo está formado por dos placas de PMMA idénticas en las que se sitúan los canales (6 mm x 2 mm x 50 μ m) por los que se hacen pasar las disoluciones implicadas en el proceso. Para ello, se acoplan a la entrada de cada placa

sendas bombas de jeringa que mantienen las disoluciones en movimiento durante el tiempo que dura la extracción. Al igual que en caso anterior, las placas se separan mediante una lámina plana de polipropileno sobre la que se inmoviliza el disolvente orgánico que forma la membrana líquida. La extracción se realiza aplicando una diferencia de potencial entre los electrodos situados, uno en el tubo de salida de la fase donadora y otro en el tubo de entrada de la fase aceptora.

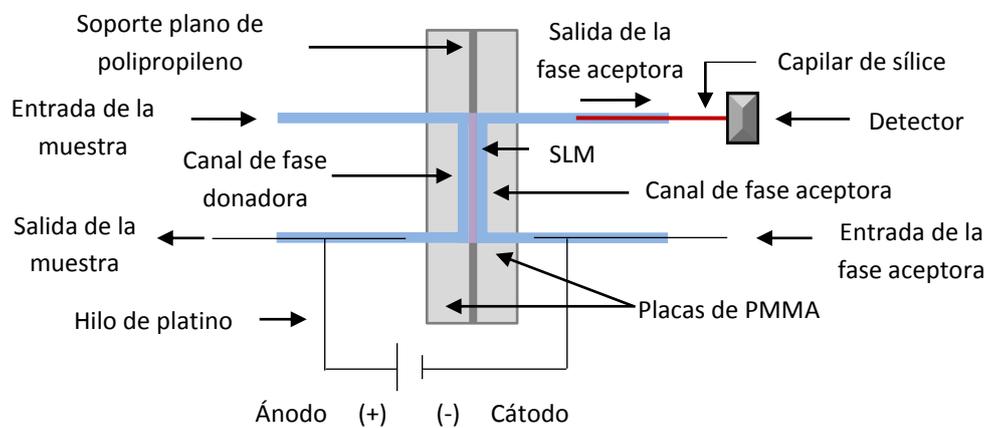


Figura 1.19. Dispositivo microfluídico *on-chip* dinámico (sistema de doble flujo) [89].

Estos dispositivos permiten obtener recuperaciones de extracción muy elevadas y pueden operar tanto en modo on-line, acoplados directamente al instrumento de medida, como en modo off-line, en el que la fase aceptora se recoge una vez finalizada la extracción para su posterior análisis.

Al igual que en casos anteriores, se han propuesto modalidades que permiten el análisis simultáneo de compuestos de distinta naturaleza. Todas las que se conocen hasta la fecha se llevan a cabo en modo off-line.

En 2016, Y.A. Asl, et al. diseñaron un dispositivo que permitía la extracción simultánea de compuestos básicos de distinta polaridad [150]. El sistema estaba formado por dos placas de PMMA idénticas, cada una con dos canales separados y dispuestos de forma consecutiva, lo que permite el uso independiente de dos láminas de polipropileno como soporte, impregnadas cada una con un disolvente orgánico distinto. En este diseño, los electrodos se colocan en el interior de los canales por los que pasan las fases donadora y aceptora, encontrándose tanto los electrodos como los canales conectados en serie (Figura 1.20). El dispositivo funciona en modo semi-dinámico, de forma que la fase aceptora permanece fija durante la extracción mientras que la fase donadora se mantiene en movimiento mediante una bomba de jeringa. El procedimiento se aplicó para analizar la presencia de betaxolol, naltrexona y nalmeveno en muestras de plasma y orina.

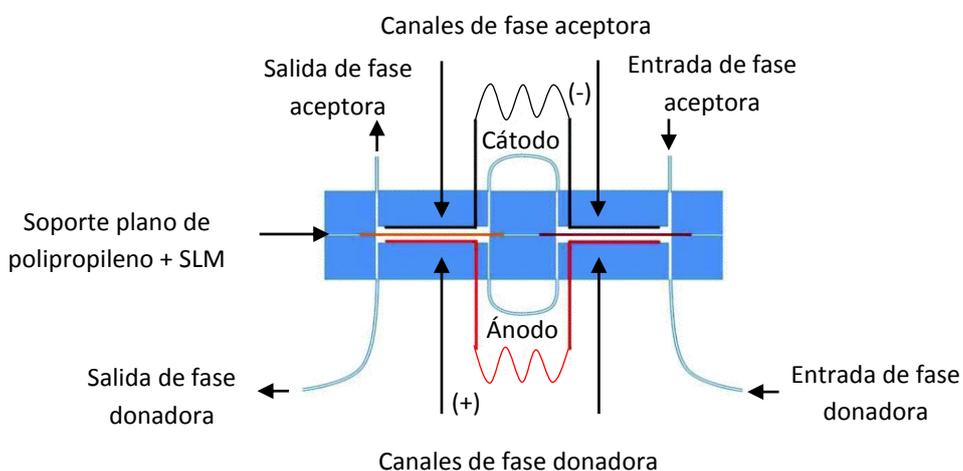


Figura 1.20. Dispositivo microfluídico *on-chip* semi-dinámico para la extracción simultánea de compuestos básicos de distinta polaridad [150].

Los mismos autores, utilizaron este mismo diseño para la extracción simultánea de analitos ácidos y básicos pero en esta ocasión sólo los canales para la fase donadora estaban conectados en serie [146] Como resultado, se precisa el uso de dos fuentes de voltaje individuales conectadas, cada una, a una pareja diferente de electrodos (Figura 1.21). Al igual que en el caso anterior, la extracción se realizó con el dispositivo operando en modo semi-dinámico, de forma que los analitos ácidos se extraen a una fase aceptora básica y los básicos a una fase aceptora ácida que permanecen fijas en sus correspondientes canales. El método se aplicó al análisis de ácido mefenámico, diclofenaco (fármacos ácidos) y betaxolol (fármaco básico) en muestras de plasma y orina humana utilizando 1-octanol y NPOE como SLM, respectivamente.

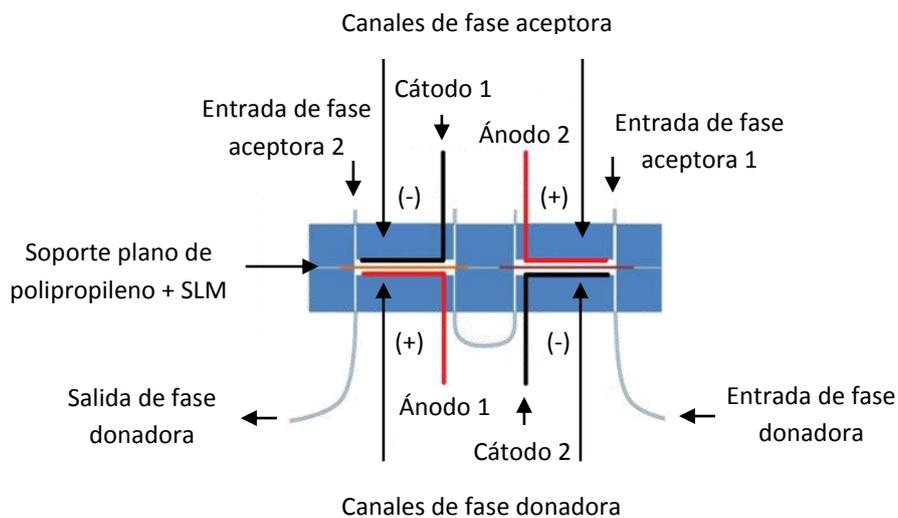


Figura 1.21. Dispositivo microfluídico *on-chip* semi-dinámico para la extracción simultánea de compuestos ácidos y básicos [146].

Más recientemente, F. Zarghampour et al. [172] han propuesto un diseño que permite la extracción simultánea de compuestos ácidos

(diclofenaco) y básicos (nalmefeno) usando un sólo canal para la fase donadora (Figura 1.22). El dispositivo consta de tres placas de PMMA de forma que entre las placas de los extremos y la central, se coloca una lámina de polipropileno impregnada cada una de ellas con el disolvente apropiado para la extracción de cada tipo de analito. Por el canal central se hace pasar continuamente la fase donadora impulsada por una bomba de microjeringa, mientras que en los canales de los extremos se colocan las fases aceptoras estáticas y los correspondientes electrodos (el ánodo sumergido en la fase aceptora hacia la que migran los analitos ácidos y el cátodo en la fase aceptora hacia la que migran los analitos básicos), que van conectados a una única fuente de voltaje.

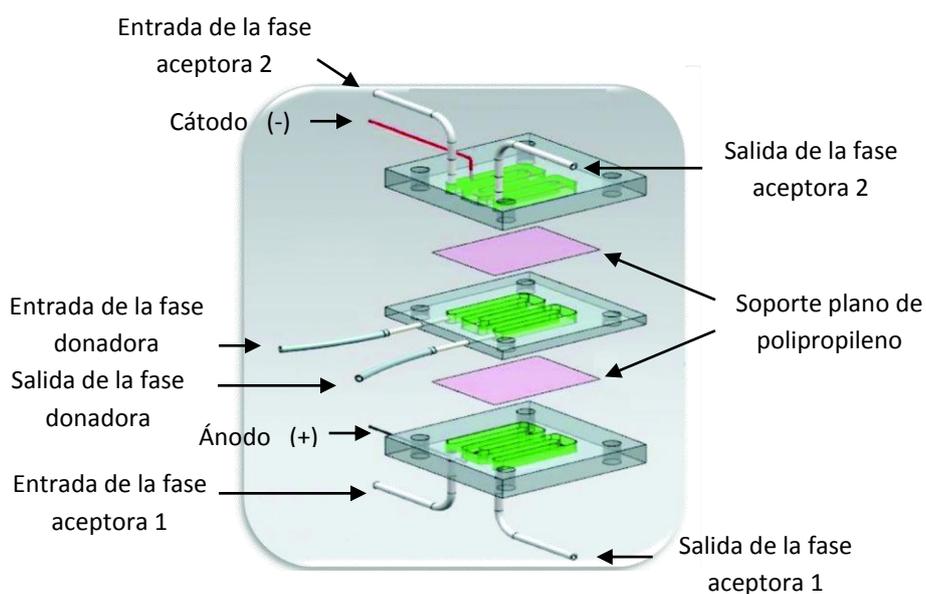


Figura 1.22. Dispositivo microfluídico *on-chip* semi-dinámico con un solo canal de fase donadora para la extracción simultánea de compuestos ácidos y básicos [174].

Poco después, K. Wajid Ali et al. [173], proponen el uso de un dispositivo similar para el análisis simultáneo de fármacos básicos de

distinta polaridad. La estructura básica del dispositivo, es idéntica a la empleada por F. Zarghampour. et al, con la diferencia de que, en este caso, se emplean tres electrodos. Uno de los electrodos se sitúa en el canal central y actúa como ánodo, mientras que los otros dos actúan como cátodos y se sitúan, cada uno, en uno de los canales para la fase aceptora. Nuevamente, la fase donadora se hace pasar por el canal central, impulsada por una bomba de microjeringa, mientras que en los canales de los extremos se colocan las fases aceptoras estáticas. En este caso, ambas fases aceptoras tienen una composición idéntica, por lo que será la naturaleza de la membrana líquida la que determine hacia dónde migra cada uno de los analitos estudiados. Este dispositivo se ha aplicado para el análisis de betaxolol (fármaco apolar), atenolol y betaxolol (fármacos polares) en muestras biológicas de plasma y orina.

Las técnicas de tratamiento de muestras que emplean dispositivos microfluídicos, atraen cada vez más el interés de los investigadores ya que permiten: (a). renovar las disoluciones donadora y aceptora de manera continua durante la extracción, (b). una transferencia de masa más rápida y eficaz debido a que la distancia entre los analitos y la SLM es mucho más reducida, del orden de los micrómetros, (c). obtener una elevada selectividad y un eficiente *clean-up*, (d). reducir el consumo de reactivos y de disolventes orgánicos así como (e). analizar pequeños volúmenes de muestra, siendo esto último de gran importancia cuando se dispone de cantidades limitadas de la misma. A todo esto, hay que sumar la posibilidad de automatización y acoplamiento con las técnicas instrumentales de análisis [174]. Al igual que ocurría con las fibras huecas, los soportes planos se desechan tras cada uso, lo que elimina la posibilidad de que se produzcan contaminaciones cruzadas.

Paralelamente al desarrollo de los dispositivos microfluídicos, se implementaron otros sistemas de EME estáticos que permitían la extracción exhaustiva de los compuestos presentes en la muestra. El compartimento para la fase aceptora, está formado por una punta de micropipeta en cuyo extremo de mayor diámetro se fija térmicamente una pequeña pieza de la lámina plana que actúa como soporte para la SLM. Seguidamente, el soporte se impregna con la membrana líquida y la punta de pipeta se llena con la fase aceptora que, finalmente, se introduce en la fase donadora. De este modo, el soporte junto con la SLM, permanecen en contacto con ambas disoluciones en una configuración horizontal. Por último, dos electrodos con forma de "L" se colocan en el interior de cada compartimento y se conectan a la fuente de voltaje (Figura 1.23). Este dispositivo se ha aplicado con éxito para la extracción exhaustiva de péptidos [175], de fármacos ácidos [176] y de fármacos básicos [177] en muestras de plasma humano. Sin embargo, no ofrecen la posibilidad de preconcentrar las muestras dado que emplean el mismo volumen de fase donadora y aceptora.

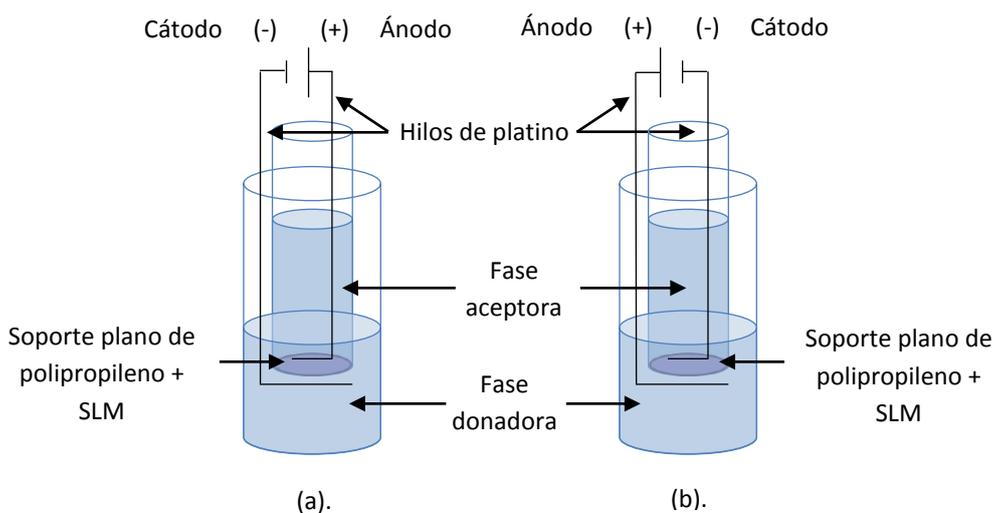


Figura 1.23. Dispositivo para la EME exhaustiva de analitos: (a). ácidos, (b). básicos.

De igual modo, se han descrito dispositivos similares para el análisis de fármacos y compuestos ácidos de elevada polaridad en los que el soporte plano se coloca, bien en el fondo de un tubo capilar de vidrio [178,179] o en el tapón de un vial de inyección [140,148]. En estos casos, se utilizan soportes para la SLM distintos a las láminas planas de polipropileno y volúmenes de fase donadora mayores a los de la fase aceptora.

Si bien, el área superficial de las membranas planas es mucho menor en comparación con las fibras huecas, estos dispositivos permiten utilizar mayores volúmenes de fase aceptora, elemento clave para lograr extracciones exhaustivas y minimizar los cambios de pH relacionados con las reacciones de electrolisis. No obstante, hay que tener en cuenta que al aumentar el volumen de fase la aceptora los factores de enriquecimiento disminuyen, por lo que la elección de un dispositivo u otro dependerá de las necesidades analíticas de cada caso.

También se conocen dispositivos que emplean láminas planas como soporte en una configuración vertical. En 2015, S.S.H. Davarani et al. [180], construyeron una celda de poliamida formada por dos compartimentos cúbicos con una hendidura en la parte central de una de sus paredes. El soporte de polipropileno se coloca entre las paredes hendidas de ambos compartimentos y se fija con un tornillo de acero. La membrana así dispuesta, se impregna con la SLM y en cada compartimento se coloca una de las fases junto con uno de los electrodos (Figura 1.24). Este dispositivo se utilizó para la extracción de metales pesados en muestras de agua, obteniéndose recuperaciones superiores al 93%.

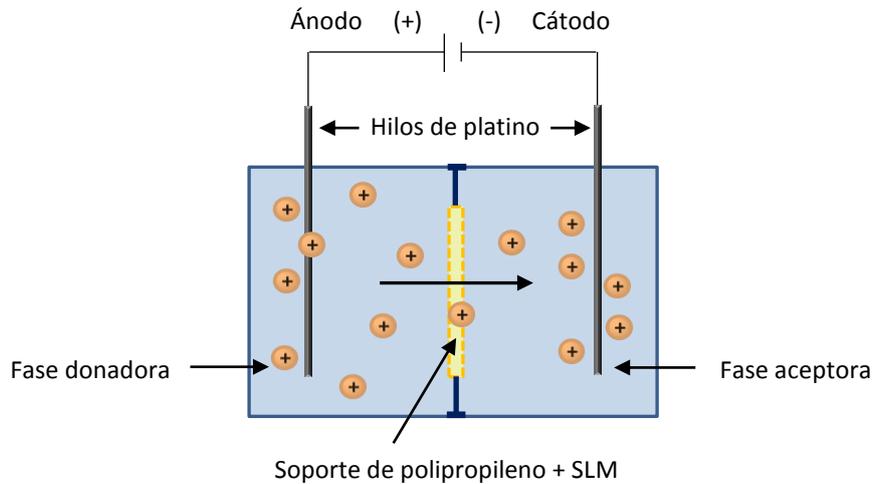


Figura 1.24. Dispositivo para la EME con láminas planas como soporte para la SLM en una configuración vertical.

Mientras que con EME el tiempo de extracción se reduce en gran medida en comparación con HF-LPME, la obtención de rendimientos elevados con los dispositivos que emplea, a menudo, sigue siendo una tarea difícil. Para tratar de solucionar este problema, L.E.E. Eibak et al. introdujeron en 2014 la extracción mediante electromembrana en paralelo (*parallel electromembrane extraction, Pa-EME*) [181,182]. Esta modalidad de EME, utiliza como dispositivos placas planas de 96 pocillos (96-well plate) en las que se coloca la fase donadora mientras que para la fase aceptora se utilizan tubos eppendorf que se cortan por la mitad y en los que se sella térmicamente el soporte de polipropileno. Para hacer que el sistema sea conductor y poder aplicar voltajes, se incorporan láminas de papel de aluminio, que actúan como cátodo y ánodo, en los pocillos de la placa de fase donadora y en el compartimento de la fase aceptora. Sin embargo, al tratarse de un sistema “casero” los resultados obtenidos no eran muy reproducibles.

Posteriormente, se desarrolló un dispositivo mejorado en el que se utilizan dos placas, una placa conductora “casera” y reutilizable de poliéter éter cetona (PEEK) en la que se coloca la fase aceptora y otra placa comercial en la que se coloca la fase donadora y que lleva incorporadas soportes de PVDF en los que se inmoviliza la SLM. En esta última, se introducen agujas de acero inoxidable a modo de electrodos. De este modo, ambas placas se acoplan entre sí y se conectan a la fuente de voltaje [183]. En Pa-EME, el área superficial de la membrana líquida es de 3 a 4 veces menor que en HF-LPME. En principio, esto lleva asociado una menor transferencia de masa, lo cual se contrarresta con la aplicación de voltajes, obteniéndose finalmente recuperaciones comparables a las de HF-LPME pero en tiempos más cortos. Además, permite realizar varias extracciones a la vez. Sin embargo, al igual que ocurría con los sistemas de extracción exhaustivos, aunque los mayores volúmenes de fase aceptora reducen los efectos de las reacciones de electrolisis sobre el pH, no permiten obtener grandes factores de enriquecimiento (Figura 1.25).

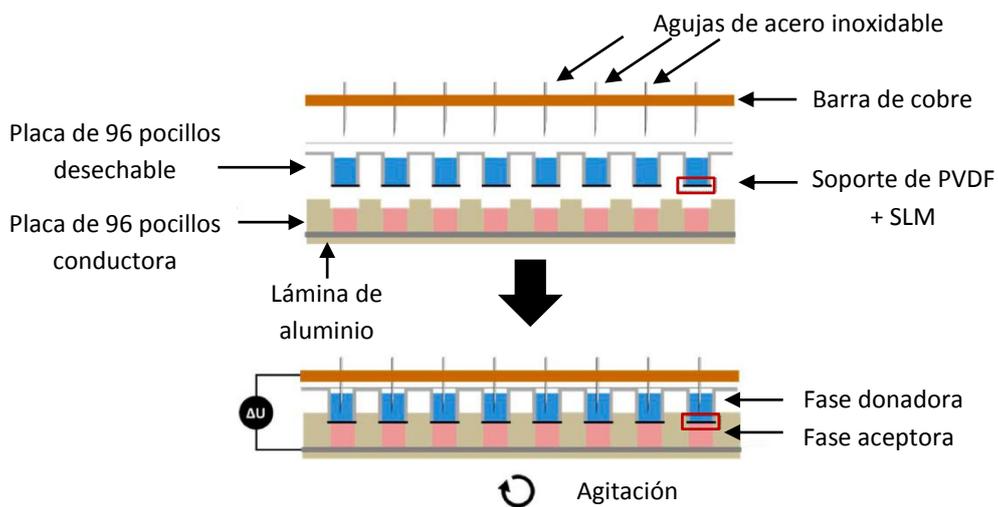


Figura 1.25. Esquema del dispositivo Pa-EME [183].

La gran variedad de dispositivos que emplean láminas planas como soporte para la SLM, permite una mayor flexibilidad, desde el punto de vista configuracional, así como una mayor capacidad de extracción que el uso de fibras huecas, por lo que la introducción de soportes basados en láminas poliméricas planas en los sistemas de EME se ha convertido en uno de los progresos más importantes de esta técnica.

1.2.4.2. Dispositivos que emplean membranas líquidas libres

Un cambio interesante en el formato técnico de EME, lo constituye el uso de dispositivos que emplean membranas líquidas libres. Las FLMs, representan la segunda categoría en la que se engloban todos aquellos sistemas de extracción electrocinética que no utilizan ningún tipo de soporte polimérico para fijar el disolvente orgánico.

Numerosos estudios, han demostrado la eficacia y la selectividad de las membranas líquidas en los procedimientos de tratamiento de muestra. Sin embargo, comportan algunos inconvenientes como la dificultad de conocer con exactitud el volumen de disolvente orgánico que se deposita en los poros del soporte y el hecho de no poder realizar un seguimiento visual de la extracción debido a la opacidad de los soportes. En ese sentido, las FLM surgen como una alternativa a las SLMs en EME. No obstante, hay que tener en cuenta que la eliminación del soporte, lleva asociada la pérdida de la selectividad que proporciona el pequeño tamaño de poro de los soportes poliméricos. El procedimiento de extracción es básicamente el mismo, con la diferencia de que ahora el disolvente orgánico no se inmoviliza en los poros de ningún soporte físico, sino que se sitúa entre las dos fases acuosas formando una delgada capa que las mantiene separadas.

Como FLM, normalmente, se selecciona algún disolvente orgánico inmiscible en agua, de lo que resulta un sistema en tres fases en el que todas las disoluciones son líquidos libres.

El primer trabajo en el que se describe el uso de membranas líquidas libres, emplea un sistema de electro-extracción en tres fases con una configuración vertical [184]. En este caso, necesariamente, el disolvente orgánico que forma la membrana líquida libre debe ser menos denso que la fase acuosa de la que se extraen los compuestos de interés. Para llevar a cabo la extracción, se coloca la FLM sobre la fase donadora, se sumerge en ésta uno de los electrodos y, a continuación, una microgota de fase aceptora se sumerge en el seno del disolvente orgánico suspendida en una punta conductora que, a su vez, va conectada a uno de los polos de la fuente de voltaje (Figura 1.26). Una característica interesante de esta configuración es la posibilidad de automatización del proceso de extracción así como que permite la preconcentración de los analitos ya que se extraen a un volumen de fase aceptora mucho menor que el que constituye en la fase donadora.

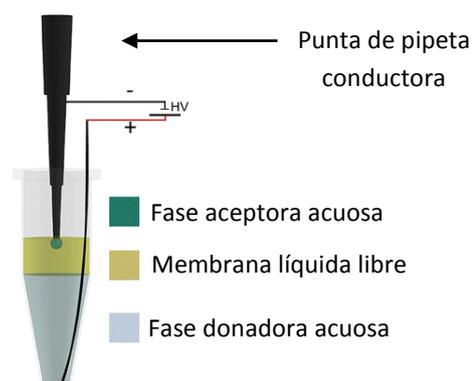


Figura 1.26. Esquema del dispositivo de EME que emplea FLM con una configuración vertical [184].

Otra configuración que emplea membranas líquidas libres, es la que se conoce como extracción mediante micro-electromembrana (*micro electromembrane extraction, μ -EME*). Se introdujo, por primera vez, en 2014 [185] y, a diferencia de la anterior, utiliza un dispositivo que opera en horizontal. Este sistema, emplea puntas de micropipeta transparentes como unidades de extracción en las que se colocan, de manera sucesiva, la fase donadora, la FLM y por último la fase aceptora, formando un sistema de extracción trifásico en el que las disoluciones se estabilizan mediante fuerzas capilares. Para llevar a cabo la extracción, se colocan los electrodos en las fases acuosas por los extremos abiertos de la punta de micropipeta y se aplica una diferencia de potencial (Figura.1.27). Una vez finalizada, la fase aceptora se recoge para su análisis y la punta de pipeta se desecha, evitando así fenómenos de contaminación cruzada o *carry over*. La μ -EME con FLMs, se caracteriza porque requiere una instrumentación simple y permite el control exacto del volumen de disolvente orgánico así como del espesor de la capa que forma, lo que hace que la FLM sea muy estable. Además, proporciona una excelente limpieza de las muestras, y consume volúmenes muy reducidos de disolventes orgánicos y de muestras, lo cual es de gran importancia cuando se disponen de cantidades limitadas de la misma. Así mismo, el uso de materiales transparentes como unidades de extracción permite el control visual de todo el procedimiento [186]. No obstante, la miniaturización de EME a μ -EME, lleva asociados algunos inconvenientes como su limitada capacidad de preconcentración, debido a que, con frecuencia, se emplean volúmenes iguales de fase donadora y aceptora. Por otra parte, dado que el sistema trabaja en ausencia de agitación, los componentes de la matriz de la muestra, como sales y otras especies químicas, tienden a acumularse en la interfase entre la fase donadora y la FLM obstaculizando la migración de los analitos. Esta última,

también se ve limitada por la menor superficie activa y el mayor espesor que presentan las FLMs en comparación con las SLMs, lo que influye negativamente en la eficacia de la extracción. Gran parte de este problema, se solucionó empleando volúmenes mínimos de cada una de las tres fases ($\leq 2 \mu\text{L}$), lo que permitió realizar extracciones exhaustivas aunque sin posibilidad de preconcentración.

P. Kubáň et al [186, 187], fueron los primeros en desarrollar y aplicar estos sistemas en el análisis de fármacos básicos (nortriptilina, haloperidol, papaverina y loperamida) en muestras de suero y orina.



Figura 1.27. Esquema del dispositivo de μ -EME.

La μ -EME, también se ha utilizado para la extracción y separación de especies catiónicas y aniónicas en dos fases aceptoras diferentes mediante el empleo de dos FLMs. Como resultado, se obtiene una configuración en cinco fases en la que la fase donadora se sitúa en el centro, rodeada de las dos FLMs, quedando las fases aceptoras en los extremos de la punta de micropipeta (Figura 1.28). Finalmente, los electrodos se sumergen en sendas fases aceptoras de forma, que al aplicar una diferencia de potencial, las especies catiónicas migran hacia el cátodo y las aniónicas hacia el ánodo [188,189].

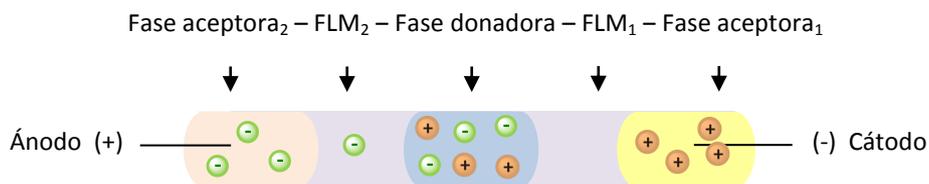


Figura 1.28. Esquema del dispositivo de μ -EME en cinco fases para la extracción simultánea de especies catiónicas y aniónicas.

Este mismo sistema de μ -EME en cinco fases, ha permitido separar diferentes fármacos básicos (nortriptilina, papaverina, mianserina y citalopram) en función de sus respectivos valores de pKa. En este caso, el orden de las fases se modifica y la fase donadora se sitúa en un extremo de la punta de micropipeta para, a continuación colocar sendas fases aceptoras separadas por las FLMs (Figura 1.29). De este modo, los analitos migran desde la fase donadora hasta su correspondiente fase aceptora en función de sus valores de pKa. Es decir, inicialmente, todos los compuestos de interés se extraen de la muestra en la que se encuentran extrayéndolos en la primera fase aceptora. Una vez en ésta, sólo los compuestos que tengan un pKa adecuado podrán migrar hasta la siguiente fase aceptora, quedando así separados [190].

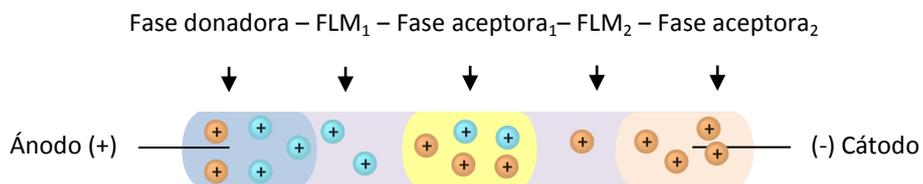


Figura 1.29. Esquema del dispositivo de μ -EME en cinco fases para la extracción simultánea de analitos básicos con distintas propiedades.

Aunque lo más habitual es que los sistemas de extracción que utilizan membranas líquidas libres presenten una configuración en tres fases, también se han descrito sistemas que utilizan dos fases. La principal ventaja de este enfoque en dos fases es que, al sumergirse uno de los electrodos en una fase orgánica, se pueden aplicar mayores voltajes sin que se generen elevadas intensidades de corriente lo que acelera la migración de los analitos. En la configuración en dos fases el volumen de fase aceptora es, habitualmente, menor que el de la fase donadora, lo que permite obtener además de altas recuperaciones, elevados factores de enriquecimiento. Esta configuración se ha utilizado para el análisis de péptidos [191,192] y fármacos ácidos [193].

1.2.5. Otros modos de operación en EME

En los últimos años se han realizado numerosas mejoras en los sistemas de extracción mediante electromembrana y el desarrollo de nuevas configuraciones y modalidades de trabajo que permitan solventar algunos de los inconvenientes que lleva asociado el uso de voltajes crece continuamente.

Entre algunas de ellas, cabe destacar la extracción mediante electromembrana a bajos voltajes (*low voltage electromembrane extraction, LV-EME*), la extracción mediante electromembrana usando pulsos de voltaje (*pulsed electromembrane extraction, PEME*), la extracción mediante electromembrana de pulsos a voltajes programados (*voltage-step pulsed electromembrane extraction, VS-PEME*) y la extracción mediante electromembrana manteniendo constante la intensidad de corriente (*constant-current electromembrane extraction, CC-EME*).

1.2.5.1. Extracción mediante electromembrana a bajos voltajes (LV-EME)

La extracción mediante electromembrana a bajos voltajes (*low voltage electromembrane extraction, LV-EME*), es una variante análoga a la EME típica, con la salvedad de que se realiza aplicando voltajes comprendidos entre 0 y 15 voltios. Este formato es de gran interés pues como se utilizan voltajes muy bajos, no hay riesgos de degradación de los analitos o de la propia muestra y se puede llevar a cabo mediante el empleo de pilas de uso común, lo que puede ser de gran utilidad para el desarrollo de dispositivos de análisis portátiles. I.J.O. Kjelsen et al. [194], fueron los primeros en aplicar esta técnica para la extracción de fármacos básicos en muestras biológicas, obteniendo recuperaciones comprendidas entre el 50 y el 93%.

1.2.5.2. Extracción mediante electromembrana pulsada (PEME)

La mayor parte de los sistemas de EME, se caracterizan porque operan en condiciones de voltaje constante. Al aplicar la diferencia de potencial se forma una doble capa eléctrica alrededor de la membrana líquida. Cuando el voltaje que se suministra es constante, los iones se acumulan en las proximidades de la doble capa a medida que transcurre la extracción, lo que conduce a un aumento de la densidad de carga en las interfases entre la SLM y las fases donadora y aceptora. Una densidad de carga elevada, puede derivar en calentamientos, en una disminución de la resistencia eléctrica de la SLM y, por lo tanto, en un aumento de la intensidad de corriente, sobre todo cuando se analizan muestras que contienen grandes cantidades de iones.

Para minimizar estos efectos, se introdujo como alternativa la extracción mediante electromembrana pulsada (*pulsed electromembrane extraction, PEME*). La técnica consiste en aplicar una diferencia de potencial constante durante un determinado intervalo de tiempo de forma que la duración de ese pulso es lo suficientemente larga como para que se dé la migración de los analitos a la fase aceptora y, a la vez, tan corta que el espesor de la doble capa se reduce. Como resultado, los iones acumulados en las interfaces se dispersan nuevamente en la disolución y la doble capa desaparece. Una vez que el sistema se estabiliza se repite el mismo procedimiento. Dado que el grosor de la doble capa se reduce al mínimo, a diferencia de otros métodos de EME, esta técnica hace que el sistema de extracción sea más estable ya que minimiza los efectos que los iones presentes en las muestras reales producen en la corriente del sistema incluso cuando se aplican altos voltajes. El uso de voltajes pulsados permite emplear voltajes más elevados lo que conduce a una reducción de los tiempos de extracción, a una mayor transferencia de masa y, por lo tanto, a un aumento de la eficacia de la extracción [115].

M. Rezazadeh et al. [195], aplicaron esta técnica por primera vez en el análisis de fármacos básicos (naltrexona y nalmefeno) en fluidos biológicos, obteniendo factores de enriquecimiento mayores que con la EME convencional.

1.2.5.3. Extracción mediante electromembrana aplicando pulsos de voltajes programados (VS-PEME)

Posteriormente a la aparición de PEME, se propuso la extracción mediante electromembrana aplicando pulsos de voltajes programados

(VS-PEME). El fundamento teórico de esta técnica es, esencialmente, el mismo de PEME con la diferencia de que, en este caso, se utiliza una rampa de voltajes que se aplican de manera escalonada. Es decir, en vez de utilizar el mismo valor de voltaje en todos los pulsos, el voltaje que se aplica en cada pulso es sucesivamente mayor al del pulso anterior. Al comienzo de la extracción, se suministra el voltaje más bajo posible y se va incrementando progresivamente hasta que se alcanza el máximo valor necesario para la extracción.

Para evaluar la eficacia de extracción de este procedimiento de EME, M. Rezazadeh et al. [196] seleccionaron tres tipos de compuestos: compuestos ácidos que, normalmente, precisan voltajes y tiempos de extracción cortos, compuestos básicos polares, que requieren tiempos y voltajes de extracción intermedios y compuestos básicos apolares, que se extraen con voltajes y tiempos más elevados. Se obtuvieron recuperaciones comprendidas entre el 44 y el 96%, resultados que, en todos los casos, fueron superiores a los que se obtienen a voltaje constante en las mismas condiciones operacionales.

Los métodos basados en PEME y VS-PEME necesitan circuitos electrónicos adicionales para el control y la temporización del potencial aplicado. Por ello, aunque el uso de estas modalidades de EME ha demostrado ser muy efectivo, la complejidad instrumental que lleva asociada ha contribuido a que este tipo de sistemas únicamente hayan sido utilizados por los autores que los desarrollaron.

1.2.5.4. Extracción mediante electromembrana manteniendo constante la intensidad de corriente (CC-EME)

Otra variante que surge como resultado de los problemas que en ocasiones supone trabajar a voltajes constantes, es la extracción mediante electromembrana manteniendo fija la intensidad de corriente (*constant current electromembrane extraction, CC-EME*). Uno de los principales inconvenientes de trabajar a un voltaje constante, es el progresivo aumento de la intensidad de corriente que, con frecuencia, se da durante la extracción. Teniendo en cuenta que valores de intensidad desmesurados pueden comprometer la estabilidad y la repetibilidad del procedimiento de extracción, parece lógico pensar que parte de estos problemas pueden eliminarse manteniendo constante la intensidad de corriente.

En ese sentido, P. Kubáň et al. [197], plantearon, por primera vez en 2012, un procedimiento para la determinación de tres fármacos básicos en muestras de suero y orina humana en el que la extracción se realiza manteniendo constante la intensidad de corriente durante todo el proceso. Para ello, acoplaron en serie una resistencia de gran tamaño a una fuente de alto voltaje. Los resultados del estudio corroboraron la hipótesis de partida, puesto que en condiciones de corriente continua el sistema era más estable y la repetibilidad era dos veces superior a la que se obtenía al trabajar a voltaje constante.

1.2.5.5. Extracción mediante electromembrana acoplada a otras técnicas

Así mismo, la extracción mediante electromembrana se ha utilizado como un paso previo en combinación con otras técnicas de

microextracción convencionales, de lo que resultan procedimientos de tratamiento de muestra híbridos con los que se obtienen muestras más limpias y una mayor selectividad.

De este modo, la EME se ha acoplado con técnicas como la microextracción líquido-líquido dispersiva (*electromembrane extraction-dispersive liquid-liquid microextraction, EME-DLLME*) [198], la microextracción por emulsificación asistida por ultrasonido (*electromembrane extraction-ultrasound assisted emulsification microextraction, EME-USAEME*) [199], la microextracción en fase sólida (*electromembrane extraction-solid phase microextraction, EME-SPME*) [200-202] y la microextracción líquido-líquido (*electromembrane extraction-liquid-liquid microextraction, EME-LLME*) [203].

No obstante, hay que tener en cuenta que estas combinaciones conllevan mayores tiempos de análisis.

1.2.6. Configuración y geometría de los electrodos empleados en EME

En todas las configuraciones de EME descritas hasta el momento, se utilizan como electrodos dos hilos conductores, normalmente de platino, dispuestos paralelamente. Como resultado, se genera un campo eléctrico plano que hace que el transporte de materia alrededor de la fibra hueca se dé en una única dirección. Aunque la mayor parte de los inconvenientes surgidos en EME están relacionados con la naturaleza de la membrana líquida y el voltaje aplicado, algunos autores han planteado la modificación de la forma y la geometría de los electrodos para mejorar el rendimiento de la extracción. En comparación con la instrumentación compleja que

requiere el control del voltaje o la corriente que pasan a través del sistema, la modificación de la forma o la geometría de los electrodos es mucho más sencilla pese a que los problemas asociados al uso de voltajes no se atribuyen directamente a la misma [204].

A continuación, se describen brevemente algunas de las modificaciones más relevantes que se han publicado.

1.2.6.1. *Electrodos con geometría cilíndrica*

Y.A. Asl et al. [205], fueron los primeros autores en proponer un cambio en la forma de los electrodos para mejorar la eficacia de la extracción. Para ello, sustituyeron el electrodo externo, que va sumergido en la fase donadora, por un electrodo cilíndrico que se coloca alrededor de la fibra hueca (Figura 1.30).

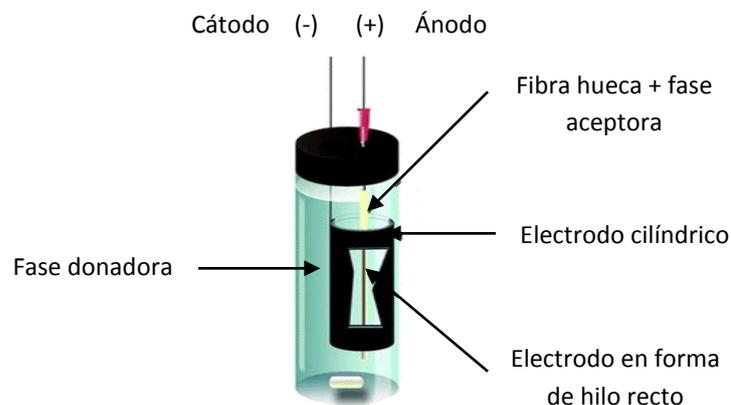


Figura 1.30. Dispositivo empleado para le EME empleando un electrodo cilíndrico [205].

Este método se aplicó a la determinación de compuestos ácidos (diclofenaco y ácido mefenámico) en muestras de plasma y orina humana.

Con esta nueva configuración se redujo el grosor de la doble capa eléctrica alrededor de la SLM, por lo que se obtuvieron mayores factores de enriquecimiento así como un sistema de extracción más estable y reproducible.

1.2.6.2. Electrodos con geometría cilíndrica y en espiral

Posteriormente, H. R. Moazami et al. [206], investigaron el efecto de la geometría de los electrodos sobre la eficacia de la extracción utilizando tres configuraciones diferentes. En todas ellas, se modificó la geometría del electrodo situado en la fase donadora, mientras que la geometría del electrodo situado en la fase aceptora se mantuvo fija.

Además de la geometría clásica, se utilizaron una geometría cilíndrica y otra en espiral (Figura 1.31). No obstante, en esta ocasión, el cambio de geometría no mejoró la eficacia de la extracción, ya que los mejores resultados se obtuvieron con la geometría clásica, seguida de la espiral y, finalmente, de la cilíndrica. Pese a que también se utilizaron compuestos ácidos como analitos modelo (diclofenaco y naproxeno), los resultados obtenidos por estos autores contradicen a los obtenidos anteriormente por Y.A. Asl et al. [205], para quienes la geometría cilíndrica mejoraba los resultados respecto de la clásica. Este comportamiento puede justificarse teniendo en cuenta que, aunque ambos autores utilizaron el mismo tipo de fibra, la misma SLM y electrodos del mismo diámetro, el espesor del electrodo cilíndrico en este caso era cinco veces menor al empleado por los primeros autores. De este modo, aun cuando el voltaje aplicado en este estudio es mayor (50 voltios frente a los 20 voltios empleados por Y. A. Asl. et al.), el menor grosor del electrodo cilíndrico hace que, en este estudio, el flujo de analitos hacia la

fase aceptora sea menor en comparación con la geometría clásica. Este comportamiento pone de manifiesto que, además de la geometría, el espesor de los electrodos también puede afectar a la eficacia de la extracción.

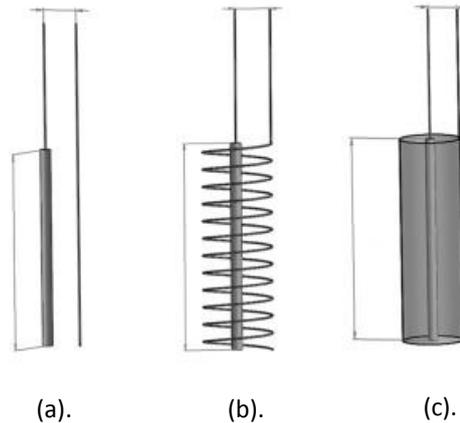


Figura 1.31. Configuraciones de electrodos empleadas por H. R. Moazami et al.: (a). clásica, (b). helicoidal, (c). cilíndrica [206].

1.2.6.3. Electrodo virtual rotatorio

Otra forma novedosa para la reducción de la doble capa eléctrica, es la presentada por S.S.H. Davarani et al. [207]. En este trabajo, la extracción se llevó a cabo utilizando una membrana líquida soportada virtualmente rotatoria. Dicha rotación se consigue mediante el uso de un conjunto de electrodos que incluye, un electrodo central en el que se coloca la fibra que contiene la fase aceptora, mientras que el electrodo externo se sustituye por cinco electrodos distribuidos de forma pentagonal rodeando a la fibra (Figura 1.32). El voltaje se suministra mediante un circuito electrónico diseñado para distribuir el potencial entre los cinco electrodos siguiendo un patrón rotatorio.

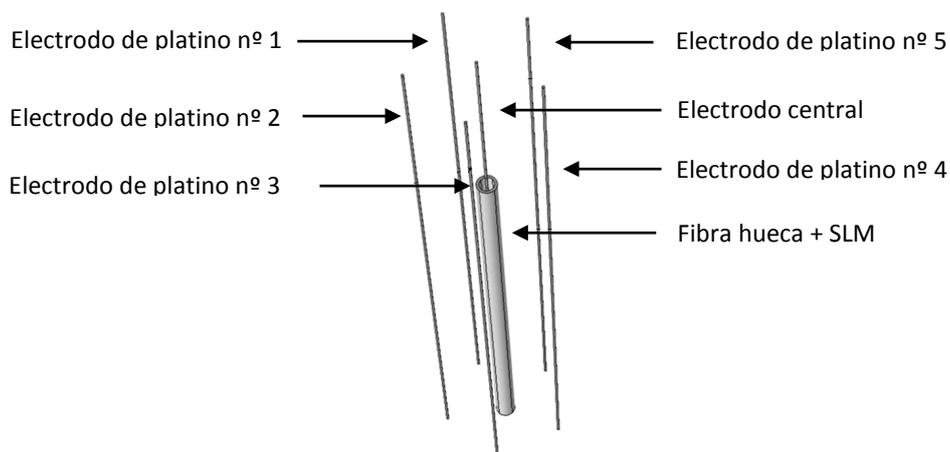


Figura 1.32. Electrodo virtual rotatorio [207].

Este sistema, se utilizó para el análisis de tres fármacos antidepresivos (verapamilo, trimipramina y clomipramina) en muestras de aguas residuales y de orina, obteniéndose recuperaciones hasta un 50% mayores que las del método convencional. El uso de esta membrana líquida virtualmente rotatoria permitió reducir el voltaje y el tiempo de extracción.

1.2.6.4. Electrodo rotatorio en la fase aceptora

La mayoría de los procedimientos de EME, se caracterizan porque utilizan un sistema estático en el que la agitación es obligatoria para mantener la homogeneidad de la muestra y aumentar la eficacia de la extracción. Sin embargo, esta agitación sólo se produce en la fase donadora, mientras que la fase aceptora permanece fija en el interior de la fibra hueca. El efecto principal de la agitación, es la reducción del espesor de la doble capa eléctrica en la interfase entre la fase donadora y la SLM, lo que aumenta la velocidad de difusión de los analitos hacia la fase aceptora

al mismo tiempo que reduce el tiempo de extracción y aumenta la transferencia de masa. Teniendo en cuenta que la transferencia total de masa depende de la migración electrocinética y de los mecanismos de convección y difusión, al permanecer fija la fase aceptora, la doble capa en la interfase entre la SLM y ésta puede interferir negativamente en la eficacia de la extracción. Pese a que el reducido diámetro interno de la fibra hueca dificulta la agitación de la fase aceptora, S. Asadi et al. [208], diseñaron un sistema formado por un electrodo giratorio conectado a un motor que permite controlar la velocidad de rotación (Figura 1.33). Como electrodo externo, se utilizó un hilo de platino recto. Este sistema con electrodo giratorio en la fase aceptora, se aplicó al análisis de tres fármacos básicos (verapamilo, haloperidol y rivastigmina) en muestra de agua y orina, obteniéndose mejores resultados así como una reducción significativa del tiempo de extracción en comparación con el método tradicional.

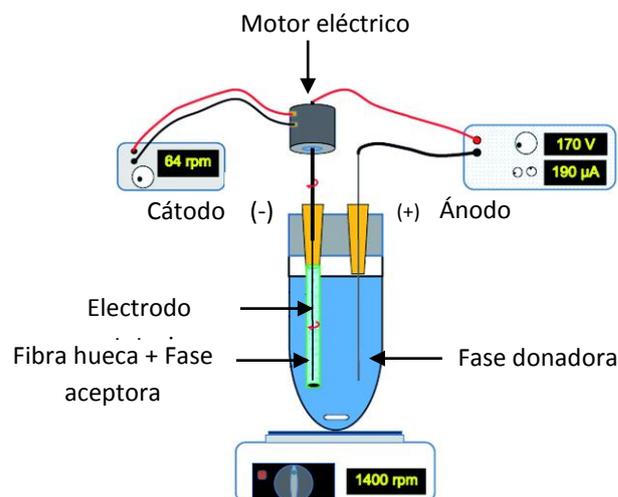


Figura 1.33. Electrodo rotatorio en la fase aceptora [208].

1.2.6.5. Electrodo de punta esférica en la fase aceptora

Recientemente, H. R. Moazami et al. [204], incorporaron, en la fase aceptora, un electrodo de platino terminado en una punta esférica (*round-head electrode*) preparado mediante un procedimiento electrotérmico sencillo y económico (Figura 1.34). El electrodo de la fase donadora se colocó paralelo a éste, manteniendo su forma recta habitual. El uso de un electrodo de este tipo permitió mejorar la estabilidad del sistema y la eficacia de la extracción de los compuestos seleccionados (amlodipina, verapamilo y clomipramina) respecto de las obtenidas con el dispositivo habitual, resultando factores de enriquecimiento entre un 40 y un 55% más elevados. La forma esférica de la punta del electrodo da lugar a la deslocalización del campo eléctrico generado en el interior de la fibra dando como resultados una mejora en la eficacia de la extracción así como un aumento de la estabilidad del sistema.

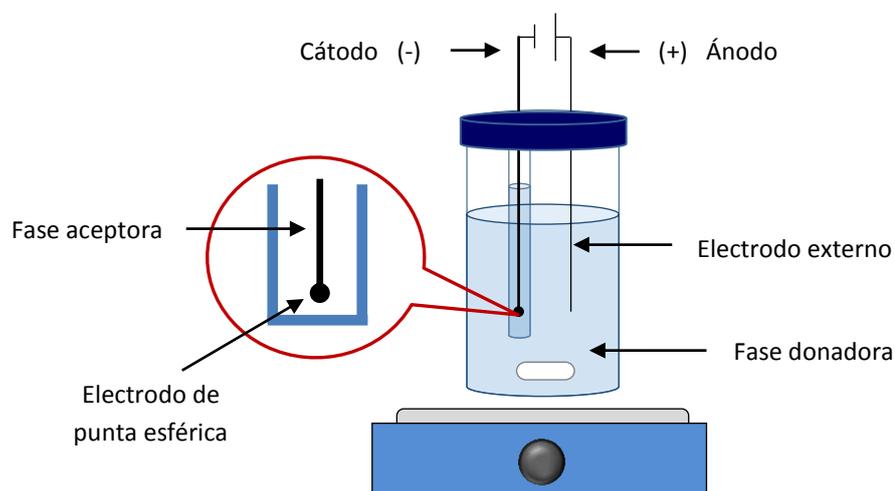


Figura 1.34. Dispositivo para la EME empleando un electrodo de punta esférica.

1.2.7. Soportes empleados en EME

Desde la publicación del primer trabajo en el que se describe la extracción mediante electromembrana como una técnica de tratamiento de muestras, la mayoría de los procedimientos desarrollados posteriormente, a excepción de los que emplean membranas líquidas libres, describen el uso de materiales porosos de polipropileno como soporte para la SLM ya sea en forma de fibra hueca o de láminas planas.

En el caso de las fibras huecas, las más empleadas son los modelos Accurel® PP Q 3/2 (diámetro interno 600 μm , espesor de pared 200 μm y tamaño de poro 0,2 μm) y Accurel® S6/2 (diámetro interno 1800 μm , espesor de pared 450 μm y tamaño de poro 0,2 μm) de la empresa alemana Membrana (Wuppertal, Alemania). Ambos tipos de fibras se diferencian fundamentalmente en el espesor de la pared y en el diámetro interno. En cuanto a las láminas planas de polipropileno, las más utilizadas son la Accurel® PP 1E R/P (100 μm de espesor) de Membrana y la Celgard 2500 (25 μm de espesor y un tamaño de poro de 0,21 μm x 0,05 μm) de la compañía americana Celgard (Charlotte, NC, EEUU). En este caso, se diferencian entre sí por el espesor y el porcentaje de porosidad.

El éxito de este tipo de soportes se debe, principalmente, a su compatibilidad con una gran variedad de disolventes orgánicos, a su pequeño tamaño de poro, que proporciona una gran selectividad al procedimiento y, sobre todo, a que se están disponibles comercialmente y son bastante económicos. Como resultado, las investigaciones se han centrado, principalmente, en la optimización de los parámetros operacionales que influyen en la transferencia de masa con el objetivo de

obtener la mayor eficacia de extracción posible, quedando los soportes en un segundo plano. Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de nuevos soportes ha despertado el interés de los investigadores en un intento de solventar algunas de las limitaciones que tienen los soportes de polipropileno, relacionadas sobre todo con la baja conductividad eléctrica de este material y con su participación pasiva en la extracción debido a la ausencia de funcionalización química. En ese sentido, se han publicado, aunque en menor medida, trabajos en los que se utilizan otros materiales poliméricos como soportes para la SLM o bien se modifican los ya existentes mediante la incorporación de algún compuesto activo en su superficie.

K.S. Hasheminasab et al. [209], fueron los primeros en proponer la sustitución de las fibras de polipropileno por fibras modificadas con nanotubos de carbono (*carbon nanotubes, CNTs*). Se trata de materiales nanométricos con excelentes propiedades térmicas, eléctricas y estructurales que han propiciado su aplicación en diversos campos de análisis químico y que pueden interactuar con moléculas orgánicas a través de una amplia variedad de enlaces. Dependiendo de la cantidad de capas de grafeno empleadas para su formación, se distinguen dos tipos: los nanotubos de carbono de una sola pared (*single wall carbon nanotubes, SWCNTs*) y los nanotubos de carbono de pared múltiple (*multiple wall carbon nanotubes, MWCNTs*), siendo estos últimos los que se utilizaron para la modificación de la fibras huecas. Para ello, se dispersaron previamente en la SLM y la dispersión resultante se hacía pasar a través de los poros de la fibra utilizando una jeringa. Posteriormente, las fibras se colocaron en un baño de ultrasonidos para que los MWCNTs se distribuyesen por toda la estructura porosa mediante fuerzas capilares.

Finalmente, el exceso de MWCNTs se eliminaba lavando varias veces las fibras con agua.

Estos nuevos soportes proporcionaron un excelente *clean-up* así como una buena selectividad y eficacia de extracción, pues en todos los casos los factores de enriquecimiento fueron superiores a los obtenidos con la fibra sin modificar. Esto es debido a la mayor área superficial y a la elevada capacidad de absorción ofrecida por los CNTs. Las fibras se desechaban tras cada uso, para evitar que se produjesen contaminaciones cruzadas (*carry over*).

Las fibras así modificadas, se han utilizado para la determinación de fármacos ácidos en muestras biológicas y aguas residuales [210], fármacos básicos en muestras de orina humana [209] y hormonas vegetales en muestras de tomate [211].

Además de nanotubos de carbono, se ha propuesto el uso de nanopartículas metálicas para la modificación de los soportes. En ese sentido, se han empleado fibras huecas decoradas con nanopartículas de plata para la extracción de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) [212] y fibras decoradas con nanopartículas de cobre para la extracción de propiltiouracilo en muestras de orina [213]. En ambos casos, la presencia de nanopartículas metálicas logró mejorar los factores de enriquecimiento respecto de los obtenidos con la fibra sin modificar. Las nanopartículas de plata se sintetizaron mediante un procedimiento de reducción química utilizando nitrato de plata y borohidruro de sodio como agente reductor. En este caso, las nanopartículas se depositan directamente en la fibra durante la síntesis, ya que se sumergen en la disolución de borohidruro de

sodio, sobre la que se añade, gota a gota, la disolución de nitrato de plata. Por su parte, las nanopartículas de cobre se sintetizaron primero y, posteriormente, se depositaron en las fibras mediante un procedimiento análogo al descrito para la deposición de los nanotubos de carbono.

Al margen de los soportes de polipropileno, otros autores han empleado fibras elaboradas a partir de membranas de inclusión poliméricas (*hollow polymer inclusion membrane, HPIM*) (20 μm de espesor, diámetro interno de 1,3 mm) para la determinación de anfetaminas (compuestos básicos) en plasma humano. Para la síntesis se utilizó triacetato de celulosa (CTA) como polímero base, TEHP como plastificante y D2EHPA como *carrier* aniónico [214]. Estas fibras se han utilizado también para la extracción simultánea de herbicidas catiónicos y aniónicos en muestras de agua de río [215]. Para ello, se utilizan dos fibras que se colocan una en el cátodo, para la extracción de los analitos catiónicos, y otra en el ánodo, para la extracción de los analitos aniónicos. Ambas fibras se sintetizan utilizando CTA como polímero base y TEHP como plastificante, con la diferencia de que la fibra en la que se extraen los compuestos catiónicos presenta un *carrier* aniónico en su composición (D2EHPA) mientras que para la fibra en la que se extraen los compuestos aniónicos se utiliza un *carrier* catiónico (Aliquat® 336).

Respecto a los soportes con geometría plana, en los últimos años se han publicado algunas alternativas al uso de membranas de polipropileno entre las que cabe destacar láminas de gel de agarosa, films de agar con nanopartículas de plata, membranas de inclusión polimérica (*polymer inclusion membranes, PIMs*), membranas de quitosano y tejidos nanoestructurados, Tiss-OH®.

Las membranas de gel de agarosa, se preparan disolviendo agarosa en polvo en una disolución de ácido clorhídrico (HCl, pH:1,5) que se calienta para favorecer la disolución del polisacárido. Finalmente, un determinado volumen de esta disolución se vierte en un tubo eppendorf, donde se enfría y se forma la membrana (7 mm de espesor). H. Tabani et al. [216] emplearon estos soportes para la extracción de fármacos básicos de distinta polaridad (rivastigmina, verapamilo, amlodipina y morfina) en muestras de agua. Posteriormente, estos mismos autores, propusieron la síntesis de membranas similares, en las que la agarosa se disolvía en agua, para la determinación de fenilalanina y tirosina en plasma humano y zumo de frutas [217].

Por su parte, la elevada capacidad de gelificación del agar en medio acuoso, lo convierte en un buen candidato para la preparación de membranas plásticas poliméricas que pueden tener utilidad como soporte para EME. Partiendo de esta premisa, C. Román-Hidalgo et al., han propuesto films de agar con nanopartículas de plata como soporte para la extracción de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) [178]. Estos films se obtienen al añadir sobre una mezcla de agar-agar, etanol y polivinilpirrolidona (PVP), una disolución de nitrato de plata (AgNO_3) gota a gota. Esta mezcla se calienta a reflujo en oscuridad, tras lo cual se obtiene una disolución amarilla de la que, posteriormente, se vierte un determinado volumen sobre una placa Petri para la formación del film (espesor 20 μm).

También se ha descrito el uso de membranas de inclusión poliméricas (*polymer inclusion membranes, PIMs*) en formato plano como soporte para la extracción de surfactantes aniónicos en muestras dopadas de agua de

rio. Estas membranas se preparan utilizando triacetato de celulosa como polímero base, NPOE como plastificante y Aliquat®336 como *carrier* catiónico [218]. Membranas con una composición similar (triacetato de celulosa como polímero base y Aliquat®336 como plastificante y *carrier* catiónico) se han propuesto para el análisis de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y compuestos ácidos de elevada polaridad en muestras de orina [148].

Recientemente, se ha publicado un procedimiento de EME en el que se describe la síntesis y el posterior empleo de membranas de quitosano como soporte para la SLM en la determinación de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y compuestos ácidos de elevada polaridad en muestras de orina [179]. Las membranas se sintetizan a partir de una disolución de quitosano de alto peso molecular en ácido acético, cuyo pH se ajusta al valor deseado (< 6,5) con una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M que se añade gota a gota. Esta disolución se vierte sobre Aliquat®336, que actúa como plastificante y como *carrier* catiónico. La mezcla que resulta, se extiende sobre una placa Petri para que se forme una película (30-35 µm espesor).que, finalmente, se lava con NaOH 0,1 M y agua para eliminar el exceso de ácido acético.

Por último, cabe destacar el uso de tejidos nanoestructurados (Tiss-OH®) como soportes para la SLM [140]. Se trata de un material disponible comercialmente (100 µm espesor, tamaño de poro 1-3 µm) compuesto por nanofibras poliméricas acrílicas, altamente difusivo, con una elevada superficie específica y de fácil funcionalización que se obtiene mediante un procedimiento de electrospinning. Presentan grupos hidroxilo (OH⁻) en su estructura, lo que los convierte en materiales hidrofílicos

aunque son insolubles en agua y en disolventes apolares. Como resultado, mantienen su estructura tanto en medios acuosos como orgánicos, características que han permitido su uso como soportes para la extracción electrocinética de compuestos ácidos de elevada polaridad.

Como puede verse, el número de aplicaciones en las que se describe el uso de materiales diferentes al polipropileno como soportes para los procedimientos de extracción mediante electromembrana es aún muy reducido. Además, en la mayoría de los casos estos materiales no están disponibles comercialmente lo que puede suponer un inconveniente a la hora de reemplazar a los de polipropileno a pesar de que en algunos casos se obtienen mejores resultados.

Pese a que la extracción mediante electromembrana se desarrolló hace poco más de una década, en los últimos años se han implementado numerosas configuraciones y aplicaciones que la convierten en una línea de investigación de gran interés y muy activa que está en continuo crecimiento. Esto se debe, fundamentalmente, a varias propiedades únicas de la técnica, relacionadas con la posibilidad de controlar la selectividad de la extracción en función de la naturaleza de la SLM y de la dirección del campo eléctrico suministrado, ya que no se conocen otras técnicas que ofrezcan esta posibilidad. Por otra parte, presenta numerosas ventajas ya que reduce los tiempos de análisis, requiere una instrumentación sencilla y de bajo coste, consume pequeños volúmenes de muestra y de disolventes orgánicos y proporciona un excelente *clean-up*, incluso cuando se trata de muestras biológicas y medioambientales muy complejas. Además, ofrece la posibilidad de automatización lo que permitirá, en pocos años, el desarrollo de equipos disponibles comercialmente y fáciles de usar que

harán posible la implantación de esta técnica en los laboratorios para llevar a cabo los análisis de rutina.

1.3. APLICACIONES

La gran selectividad obtenida con la extracción mediante electromembrana, hace de esta técnica un método de preparación de muestras muy atractivo que ha sido aplicado a al análisis de muestras con matrices de gran complejidad, proporcionando, además, elevados factores de enriquecimiento y un alto grado de sensibilidad.

En ese sentido, la extracción mediante electromembrana se ha aplicado con éxito al análisis de una amplia gama de compuestos de distinta naturaleza presentes en muestras de origen biológico (sangre, orina, suero, leche materna, etc.), medioambiental (aguas residuales, agua de mar, agua potable, etc.) e incluso alimentario (zumos, bebidas alcohólicas, frutas, etc.). Entre los compuestos encontrados en este tipo de muestras, cabe destacar: fármacos, tanto de uso humano como veterinario, cationes de metales pesados, herbicidas extremadamente tóxicos y diversos contaminantes orgánicos. No obstante, desde su aparición, la mayor parte de las aplicaciones de EME se han centrado en el análisis de compuestos orgánicos de origen farmacológico y biomédico contenidos, principalmente, en fluidos biológicos.

De este modo, en el ámbito del análisis farmacéutico, se han conseguido determinar una amplia variedad de medicamentos, tanto de carácter ácido como básico y de muy distinta polaridad mediante la técnica de extracción mediante electromembrana (Tablas 1.1, 1.2 y 1.3).

Por otra parte, en el área del análisis biomédico, se ha logrado la extracción de aminoácidos, péptidos y hormonas, pues al tratarse de compuestos naturalmente cargados, la migración de éstos a través de un campo eléctrico se ve favorecida (Tabla 1.4). En este caso, el desarrollo de separaciones predecibles y altamente selectivas en sistemas EME que son compatibles con fluidos biológicos, puede ser una herramienta valiosa para futuras aplicaciones biomédicas.

Finalmente, y aunque la mayor parte de las aplicaciones que se conocen hacen referencia a la determinación de compuestos de naturaleza orgánica, también se han conseguido extraer, pero en menor medida, algunos cationes metálicos como el Pb (II), el Zn (II), el Li (I) o el Bi (III) en muestras de sangre, orina o líquido amniótico (Tabla 1.5).

Tabla 1.1. Aplicaciones de EME en muestras biológicas para la determinación de fármacos básicos no polares (log P > 2.5).

| SLM | Analito ^a | Log P | Muestra (matriz) | Intervalo de voltaje (voltios) | Intervalo de tiempo (minutos) | Referencia |
|-----------------------------------|--|-----------|--|--------------------------------|-------------------------------|--|
| 2-etil hexanol | VER, ZOL, HAL, CLO, TMP | 3.79-5.15 | Orina, Plasma | (100-300) | (10-20) | [156], [207], [209], [219], [220] |
| 2-etil nitrobenzeno (ENB) | CIT, TRM, PRX, DOI, PPV, FLV, FLX, MTD, LOP, HAL, SER, NOR, AMI | 2.51-4.92 | Orina, Plasma, Sangre, Suero | (4-300) | (5-60) | [117], [132], [186], [190], [197], [221], [222], [223] |
| 1-heptanol | CIT, IMIP, SER, DES | 2.51-4.90 | Orina | 60 | 15 | [128] |
| 1-isopropil-4-nitrobenzeno (IPNB) | FLX, MTD, LOP, HAL, NOR, AMI | 4.09-4.92 | Leche materna, Orina, Plasma | (9-32) | (5-10) | [182], [194] |
| 2-nitrofenil octil éter (NPOE) | CIT, TRM, FNZ, BET, MBDZ, IMM, PPR, CLZ, SUF, BUP, DOX, FLX, DXM, AML, MTD, LOP, HAL, IMIP, SER, CLO, NOR, AMI, TMP, TOL | 2.51-5.77 | Leche de vaca, Orina, Plasma, Sangre, Sangre seca, Suero | (15-300) | (5-34) | [92], [109], [132], [146], [161], [171], [173], [175], [182], [186], [198], [209], [224], [225], [226], [227], [228], [145], [229], [230], [231], [232], [233], [234], [235], [236], [237], [238], [239] |

(Continuación)

| | | | | | | |
|---|---------------|-----------|---------------------------------|----------|---------|--------------------------------------|
| 4-nitrocumeno | PPV, NOR | 2.95-5.65 | Orina | 250 | 15 | [189] |
| 2-nitrofenil pentil éter (NPPE) | OLZ, FLX | 2.56-4.09 | Orina, Plasma | 200 | 30 | [240] |
| 1-octanol | TRM, SUF, MTD | 2.51-4.20 | Leche materna, Orina, Plasma | (40-80) | 20 | [130], [241] |
| IPNB + TEHP ^b | BUP, MTD | 3.43-4.20 | Saliva, Sangre seca | 25 | 10 | [242] |
| NPOE + D2EHPA ^c | NALM, BET | 2.65-2.81 | Orina, Plasma | (40-100) | (14-33) | [127], [134], [150], [161], [172] |
| NPOE + D2EHPA ^c + TEHP ^b | BET, PRP | 2.81-3.10 | Saliva | 250 | 10 | [158] |
| NPPE + D2EHPA ^c | NALM | 2.65 | Orina, Plasma | 100 | 20 | [195] |

^aAMI: amitriptilina, AML: amlodipino, BET: betaxolol, BUP: buprenorfina, CIT: citalopram, CLO: clomipramina, CLZ: clozapina, DOI: 2,5-dimetoxi-4-yodoanfetamina, DOX: doxepina, DXM: dextrometorfano, FLV: fluvoxamina, FLX: fluoxetina, FNZ: fenazopiridina, HAL: haloperidol, IMIP: imipramine, IMM: imatinib mesilato, LOP: loperamida, NALM: nalmeveno, NOR: nortriptilina, MBDZ: mebendazol, MTD: metadona, OLZ: olanzapina, PPV: papaverina, PROP: propanolol, PRX: paroxetina, SER: sertralina, TMP: trimipramina, TOL: tolterodina, TRM: tramadol, VER: verapamilo, ZOL: zolpidem

^bTEHP: tris (2-etilhexil) fosfato

^cD2EHPA: ácido di (2-etilhexil) fosfórico

Tabla 1.2. Aplicaciones de EME en muestras biológicas para la determinación de fármacos básicos polares ($\log P < 2.5$).

| SLM | Analito ^a | Log P | Muestra (matriz) | Intervalo de voltaje (voltios) | Intervalo de tiempo (minutos) | Referencia |
|-----------------------------------|--------------------------------------|------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| D2EHP | MTR, SOT, BEN, FPA, TRI, EFE | -0.27-1.05 | Plasma | 100 | 20 | [243] |
| 2-etil hexanol | COD, MANF, KET, RIV | 1.20-2.24 | Leche materna, Orina, Plasma | (100-300) | (10-25) | [153], [156], [208], [219], [244] |
| 2-etil nitrobenzeno (ENB) | CAT, MDA, MDMA, MANF, PRC, MBDB, PTD | 1.16-2.34 | Orina, Plasma, Sangre | (10-200) | (5-10) | [117], [188], [222] |
| 1-isopropil-4-nitrobenzeno (IPNB) | PTD | 2.34 | Leche materna, Orina, Plasma | 9 | 5 | [194] |
| 2-nitrofenil octil éter (NPOE) | QTP, PTD, TEB | 1.57-2.35 | Orina, Plasma | (15-300) | (5-10) | [109], [132], [160], [171], [175] |
| 1-octanol | KET, ALF | 2.16-2.18 | Leche materna, Orina, Plasma | (40-250) | 20 | [163], [241] |

(Continuación)

| | | | | | | |
|---|--|-----------|---------------|-----------|---------|---|
| IPNB + TEHP ^b | PMA, MANF | 1.72-1.94 | Saliva | 25 | 10 | [245] |
| NPOE + D2EHPA ^c | ATE, MOR, OxMOR, EFE, COD, CLO, NALT, NLX | 0.16-2.09 | Orina, Plasma | (90-110) | (10-71) | [127], [150], [161], [226], [246], [247], [248] |
| NPOE + TEHP ^b | ANF, MDMA, LEV, KET, MDEA, PTD | 1.81-2.34 | Orina | (200-250) | (7-15) | [249], [250], |
| NPOE + D2EHPA ^c + TEHP ^b | ATE, MOR | 0.16-0.43 | Orina, Saliva | (70-250) | (20-24) | [158], [251] |
| NPOE + Óxido de Grafito | PMPX | 2.34 | Orina | 150 | 15 | [252] |
| NPPE + D2EHPA ^c | NALT | 1.80 | Orina, Plasma | 100 | 20 | [195] |

^aALF: alfentanil, ANF: anfetamina, ATE: atenolol, BEN: benzamidina, CAT: cationina, CND: clonidina, COD: codeína, EFE: efedrina, FPA: fenil propanol amina, KET: ketamina, LEV: levamisol, MANF: metanfetamina, MBDB: 1,3-benzodioxolil-N-metil butanamina, MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina, MDEA: 3,4-metilenodioxi-N-etil anfetamina, MDMA: 3,4-metilenodioxi-metanfetamina, MOR: morfina, MTR: metaraminol, NALT: naltrexona, NLX: naloxona, OxMOR: oximorfona, PMA: para-metoxianfetamina, PMPX: pramipexol, PRC: procaína, PTD: petidina, QTP: quetiapina, RIV: rivastigmina, SOT: sotalol, TEB: tebaína, TRI: trimetoprima

^bTEHP: tris (2-etilhexil) fosfato

^cD2EHPA: ácido di (2-etilhexil) fosfórico

Tabla 1.3. Aplicaciones de EME en muestras biológicas para la determinación fármacos ácidos.

| SLM | Analito ^a | Log P | Muestra (matriz) | Intervalo de voltaje (voltios) | Intervalo de tiempo (minutos) | Referencia |
|--|--|-----------|--|--------------------------------|-------------------------------|--|
| 1-butanol | SAL, KTR, LOX | 2.06-2.61 | Sangre | 12 | 5 | [253] |
| 1-octanol | SAL, VALP, NAX IBU, DIC, MEF, EVAL | 2.06-6.42 | Lecha materna, Orina, Plasma, Sangre | (7-400) | (5-33) | [148], [179], [254], [241], [163], [157], [153], [160], [188], [134], [172], [255], [146], [256] |
| 1- octanol + 2- nitrofenil octil éter (NPOE) | QUI, KTP, PRB, IBU, FLUR, GEM | 2.02-4.39 | Plasma | 10 | 20 | [176] |
| 1-octanol + CNTs ^b | NAX, IBU | 3.00-3.72 | Lecha materna, Orina, Plasma, | 5 | 10 | [210] |
| 1-octanol + grafeno | NAX, DIC | 3.00-4.06 | Orina | 68 | 16 | [257] |

^aDIC: diclofenaco, EVAL: estradiol valerato, FLUR: flubiprofeno, GEM: gemfibrozilo, IBU: ibuprofeno, KTP: ketoprofeno, KTR: ketorolaco, LOX: loxoprofeno, MEF: ácido mefenámico, NAX: naproxeno, PRB: probenecid, QUI: ácido quinaldico, SAL: ácido salicílico, VAP: ácido valproico

^bCNTs: Nanotubos de carbono

Tabla 1.4. Aplicaciones de EME en muestras biológicas para la determinación de biomoléculas.

| SLM | Analito ^a | Log P | Muestra (matriz) | Intervalo de voltaje (voltios) | Intervalo de tiempo (minutos) | Referencia |
|---|---|----------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------|
| D2EHPA ^b + TFBPA ^c | EPI, NEPI, DOP | -1,37- (-0,98) | Orina | 50 | 15 | [258] |
| ENB + D2EHPA ^b | HIS, PHE, TRP, CRT, LYS, ARG, GLY, ALA, VAL, ILE, LEU, PRO, | -3,32- (-1,05) | Orina, Plasma, Sangre, Suero | 50 | 10 | [259] |
| NPOE + D2EHPA ^b + TEHP ^d | HIS, PHE, TRP | -3,32-(-1,05) | Sangre, Saliva, Suero | 100 | 20 | [260] |
| 1-octanol + Di-IBUtCet ^e + D2EHPA ^b | LEU-encefalina, Endomorfina I | - | Plasma | 20 | 5 | [261] |
| 1-octanol + D2EHPA ^b | ANG I, ANG II, ANG III, ALR, LPR, TTR, BRU | - | Plasma | 15-20 | 10-15 | [262], [263] |

^aALA: alanina, ALR: alarelina, ANG I: angiotensina I, ANG II: angiotensina II, ANG III: angiotensina III, ARG: arginina, BRU: bruselina, CRT: creatinina, DOP: dopamina, EPI: epinefrina, GLY: glicina, HIS: histidina, ILE: isoleucina, LEU: leucina, LPR: leuprorelina, LYS: lisina, NEPI: norepinefrina, PHE: fenilalanina, PRO: prolina, TRP: triptófano, TTR: triptorelina, VAL: valina

^bD2EHPA: ácido di (2-etilhexil) fosfórico

^cTFBPA: Ácido 4-(trifluorometil) fenil borónico

^dTEHP: tris (2-etilhexil) fosfato

^eDi-IBUtCet: Di-isobutil cetona

Tabla 1.5. Aplicaciones de EME en muestras biológicas para la determinación de iones metálicos.

| SLM | Analito | Log P | Muestra (matriz) | Intervalo de voltaje (voltios) | Intervalo de tiempo (minutos) | Referencia |
|---------------------------------|----------------|--------------|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Tolueno | Pb (II) | - | Líquido amniótico, sangre, suero | 300 | 15 | [264] |
| 1-octanol | Li (I) | - | Suero, Sangre | 75 | 10 | [265] |
| 1-octanol + D2EHPA ^a | Bi (II) | - | Plasma | 70 | 10 | [266] |
| 1-nonanol + D2EHPA ^a | Zn (II) | - | Orina | 10 | 20 | [267] |

^aD2EHPA: ácido di (2-etilhexil) fosfórico

Como puede verse, se han desarrollado y validado diversos métodos para el análisis de fármacos, metales pesados, aminoácidos, péptidos y hormonas en una amplia variedad de matrices biológicas (sangre, suero, plasma, orina, saliva, leche materna, etc.). Si bien, las recuperaciones, generalmente, están dentro de un rango muy amplio dependiendo de las condiciones experimentales y de las propiedades químicas de las sustancias, la extracción mediante electromembrana ha demostrado ser ampliamente compatible con este tipo de muestras, obteniéndose excelentes resultados en todos los casos.

1.4. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

En una sociedad que cada vez ejerce una mayor presión sobre los recursos naturales, prácticamente todas las actividades humanas (agricultura, industria, servicios, etc.) generan y emiten sustancias nocivas al medioambiente. Por su parte, los hábitos de consumo actuales están generando toda una serie de residuos y microcontaminantes que hace tan sólo unos años no existían o sus niveles no eran, en absoluto, preocupantes [268,269].

Los avances en el campo de la metodología analítica, han permitido la determinación y el estudio de una gran cantidad de sustancias potencialmente perjudiciales que, con anterioridad, no podían ser detectadas o bien no eran consideradas de riesgo. Dichas sustancias, se conocen con el nombre de contaminantes emergentes y se caracterizan por ser compuestos de muy diferente naturaleza química que implican riesgos por ser tóxicos, persistentes y bioacumulables [268]. Estos contaminantes, considerados altamente nocivos tanto para la salud

humana como para el medio natural, derivan principalmente de productos que se utilizan en grandes cantidades en la vida cotidiana y a nivel industrial tales como surfactantes, plásticos, hidrocarburos aromáticos, plaguicidas, cosméticos, diversos aditivos industriales y principios activos farmacológicos entre otros [270]. Aunque la presencia de estos compuestos en el medioambiente no es necesariamente nueva, sí lo es la preocupación por las posibles consecuencias de los mismos.

De todos los contaminantes emergentes, los fármacos son los que probablemente hayan generado una mayor preocupación científica e impacto social en los últimos años debido a que, constantemente, grandes cantidades de ellos entran al medioambiente como consecuencia del aumento de su consumo tanto en el ámbito doméstico como en la práctica veterinaria [271]. Los principios activos farmacológicos (analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos, ansiolíticos, hormonas, etc.) son un amplio grupo de compuestos químicos con diversas actividades biológicas, que se emplean con frecuencia para combatir enfermedades y como promotores de crecimiento en animales de granja y piscifactorías [269]. El aumento del consumo mundial de fármacos, es consecuencia directa del crecimiento de la población a nivel global, del aumento de la esperanza de vida y de su mayor disponibilidad y acceso, sobre todo en los países occidentales [272]. De este modo, su uso habitual y su inocuidad para el organismo en las dosis establecidas, han hecho que las cantidades consumidas hayan sido consideradas irrelevantes para el medioambiente durante mucho tiempo.

Tras su ingesta, los productos farmacéuticos se transforman en el organismo, en mayor o menor medida, en su forma hidrosoluble, tras lo cual, pueden permanecer como tal o bien originar nuevos productos que,

en muchos casos, poseen una actividad biológica incluso mayor que la de los productos de partida. A medida que ejercen su acción farmacológica, estos compuestos así como sus respectivos metabolitos y especies conjugadas, se excretan, normalmente, en la orina y/o las heces [273].

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), son un grupo muy variado y químicamente heterogéneo de fármacos que, pese a su diversidad estructural, presentan un mecanismo de acción común que les confiere propiedades analgésicas, antipiréticas y efectos antiinflamatorios [269,274,275].

La principal acción terapéutica de todos los AINEs, es la inhibición de la actividad de las ciclooxigenasas (COX), una enzima que convierte el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos los cuales, a su vez, se transforman en prostaglandinas y en tromboxanos, mediadores celulares que están implicados en procesos de inflamación, fiebre e intoxicación entre otros [276]. Por lo tanto, la inhibición de la ciclooxigenasa y la consiguiente síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, reduce la liberación de sustancias y mediadores inflamatorios, gracias a lo cual los AINEs alivian el dolor y la inflamación. Puede decirse entonces que la inhibición de la síntesis de prostaglandinas es la responsable de la actividad terapéutica de estos fármacos.

Debido a su eficacia en la supresión o prevención de la inflamación, los AINEs se han convertido en unos de los medicamentos más prescritos y empleados en medicina humana y veterinaria en todo el mundo [277-279].

Una de las razones de su popularidad es que, a diferencia de otros medicamentos empleados para tratar las mismas dolencias, los AINEs tienen menos efectos secundarios y no producen sedación, depresión respiratoria o adicción [280]. Además, al tratarse de medicamentos de bajo coste y de venta libre, se puede acceder a ellos sin necesidad de prescripción médica, lo que ha desencadenado un uso excesivo e inapropiado de los mismos, con el consiguiente riesgo potencial de aparición de efectos secundarios. De hecho, la sobredosis o el abuso crónico de los AINEs pueden causar complicaciones gastrointestinales y cardiovasculares [281-285].

Generalmente, las técnicas analíticas más empleadas para la determinación de este tipo de compuestos son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), [285-289], la cromatografía de gases (GC) [290,291] y la electroforesis capilar (CE) [292,293]. Sin embargo, al igual que ocurre con otros compuestos farmacológicos, el análisis directo de los AINEs en muestras biológicas no es posible debido a la complejidad de la matriz y a la baja concentración en la que se encuentran presentes en la misma [294]. Por lo tanto, es fácil comprender la necesidad de desarrollar procedimientos analíticos sencillos, eficaces, sensibles, selectivos, precisos, exactos y fiables que permitan aislar los residuos de AINEs presentes dichas muestras para su posterior identificación y cuantificación [295,296].

Sin embargo, su análisis es un proceso complejo debido a sus variadas características fisicoquímicas así como a la baja concentración y a la complejidad de la matriz en la que se encuentran. Todo ello, hace necesario disponer de métodos de análisis rápidos y robustos así como de técnicas analíticas muy específicas, con una instrumentación muy

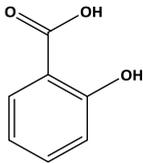
especializada y con una elevada capacidad de separación y detección que permitan su empleo en el análisis de rutina [294]. En ese sentido, se han desarrollado una gran variedad de métodos basados en el concepto de microextracción, siendo la extracción mediante electromembrana uno de los más empleados.

1.4.1. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos pueden clasificarse en base a diversos criterios, tales como su estructura química, la selectividad por el receptor sobre el que ejercen su acción (isoenzimas COX-1 y COX-2), su acción farmacológica o su vida media plasmática. De las posibles clasificaciones, las más utilizadas son las que se basan en su estructura molecular y en su vida media.

Desde el punto de vista estructural, se distinguen de 8 a 10 grupos en función de la estructura química básica sobre la que se desarrolla el fármaco (Tabla 1.6).

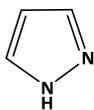
Tabla 1.6. Clasificación de los AINEs según su estructura química básica.

| Grupo terapéutico | Estructura de la que derivan | Fármaco |
|-------------------|---|---|
| Salicilatos |  <p>Ácido salicílico</p> | Ácido acetil salicílico, Ácido salicílico, Salicilamida, Diflunisal |

CAPÍTULO 1

(Continuación)

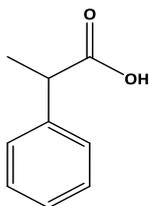
Pirazolonas



Pirazol

Metamizol, Feprazona,
Clofeprazona

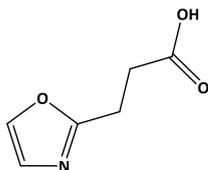
Derivados de ácidos
aril-propanoicos



Ácido 2-fenil propanoico

Ibuprofeno, Ketoprofeno,
Naproxeno, Flurbiprofeno,
Fenoprofeno

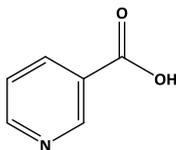
Derivados de ácidos
oxazol propanoicos



Ácido 3-(oxazol-2-il)-propanoico

Oxaprocina

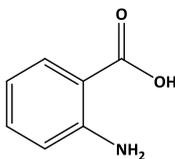
Derivados del ácido
nicotínico



Ácido nicotínico

Isonixina,
Clonixinato de lisina

Fenamatos

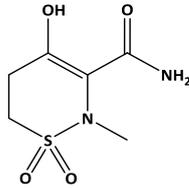


Ácido antranílico

Ácido mefenámico, ácido
meclofenámico

(Continuación)r

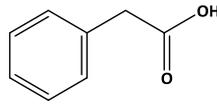
Oxicames



4-hidroxi-1,2 benzotiazina
carboxamida

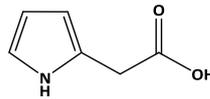
Piroxicam, Meloxicam,
Tenoxicam

Derivados del ácido
acético



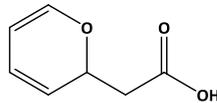
Ácido fenil-acético

Diclofenaco, Aceclofenaco



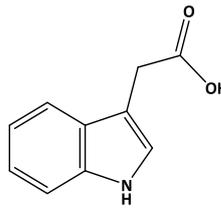
Ácido pirrol acético

Ketorolaco, Tolmetina



Ácido piranoacético

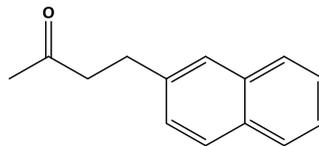
Etodolaco



Ácido indol acético

Indometacina,
Benzamidina, Oxametacina,
Sulindac

Derivados de las
naftilcanonas



Naftilbutanona

Nabumetona

Por otro lado, dependiendo de su volumen de distribución y de la velocidad de eliminación del plasma sanguíneo, la vida media de los AINEs es muy variable, razón por la cual suelen dividirse en tres grupos:

a. *AINEs de vida media corta.* Aquellos cuya vida media plasmática es inferior a 6 horas. Tienen la ventaja de que los niveles plasmáticos máximos se alcanzan antes y, en ocasiones, permite reducir la dosis total del fármaco. *Ejemplos:* ácido acetil salicílico, ibuprofeno, ácido mefenámico, diclofenaco, ketorolaco, indometacina.

b. *AINEs de vida intermedia.* Aquellos cuya vida media plasmática se sitúa entre las 6 y las 10 horas. *Ejemplos:* diflunisal, metamizol, etodolaco, sulindac.

c. *AINEs de vida media larga.* Aquellos cuya vida media plasmática se extiende por encima de las 10 horas. La mayor duración de su efecto terapéutico permite, en muchos casos, limitar a una la dosis diaria aunque dicha duración puede aumentar las interacciones con otros fármacos así como sus efectos secundarios. *Ejemplos:* naproxeno, oxaprocina, piroxicam, benzamidina, nabumetona.

1.4.2. Características de los AINEs seleccionados

Como se ha explicado anteriormente, debido al elevado consumo de antiinflamatorios no esteroideos a nivel mundial, los estudios que se desarrollan en esta Tesis Doctoral se aplican a la extracción y posterior determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución de cinco

AINEs con gran aplicación en medicina y veterinaria como son: ácido salicílico (SAL), ketoprofeno (KTP), naproxeno (NAX), diclofenaco (DIC) e ibuprofeno (IBU).

1.4.2.1. Ácido salicílico

El ácido salicílico (SAL) se comercializa habitualmente en forma de su derivado acetilado, el ácido acetil salicílico (ASA). Se trata del fármaco más antiguo, más representativo y ampliamente utilizado dentro de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos. Debido a su efecto inhibitorio no selectivo de la ciclooxigenasa, es considerado como prototipo de todos los analgésicos no opiáceos, lo que lo convierte en el analgésico, antipirético y antiinflamatorio por excelencia. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios, actualmente está siendo reemplazado por fármacos con efectos similares pero más inocuos tales como el paracetamol o el ibuprofeno [297].

Tras su ingesta, el ácido acetil salicílico se hidroliza y se convierte rápidamente en su principal metabolito activo, el ácido salicílico. El ácido salicílico se metaboliza principalmente por vía hepática y su cinética de eliminación depende de la dosis administrada. En general, la vida media de eliminación del ácido salicílico oscila entre las 2-3 horas cuando la dosis es baja, situándose alrededor de las 15 horas si la dosis es elevada [297].

El ASA, se metaboliza en un 99% a ácido salicílico y otros metabolitos (ácido salicílico, glucorónido salicílico, salicilil glucorónido, ácido gentísico y ácido gentisúrico) que se excretan principalmente por vía renal a través de la orina. Aproximadamente, un 75% se encuentra en forma de

ácido salicílico, un 15 % está en forma de conjugados mono y diglucorónicos y el 10% restante son salicilatos libres [298].

1.4.2.2. Ketoprofeno

El ketoprofeno (KTP), con una potente actividad analgésica, similar a la del diclofenaco y el ibuprofeno, es un derivado del ácido 2-fenilpropanoico. Se administra principalmente por vía oral y posee una biodisponibilidad del 90%. El ketoprofeno se metaboliza en el hígado a compuestos inactivos por conjugación con el ácido glucorónico principalmente y, en menor medida, por hidroxilación.

Se excreta principalmente por la orina, donde aproximadamente un 1% de la dosis administrada se encuentra en su forma parental, mientras que el componente glucoronoconjugado representa entre el 65 y el 85% [297].

1.4.2.3. Naproxeno

El naproxeno (NAX), al igual que el ketoprofeno, es un antiinflamatorio no esteroideo químicamente relacionado con el grupo de los ácidos arilacéticos que deriva del ácido 2-fenilpropanoico. Además de una elevada actividad antiinflamatoria, presenta propiedades analgésicas y antipiréticas notables.

Se administra principalmente por vía oral, en forma de naproxeno sódico pues, a diferencia del naproxeno base, se solubiliza fácilmente en agua y se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal,

alcanzándose niveles plasmáticos máximos al cabo de 1 a 2 horas tras su ingesta (frente a las 2-4 horas que tarda en alcanzarlas el naproxeno base). De todos los AINEs seleccionados para su estudio, es el único cuya acción se extiende más allá de las 10 horas, siendo su vida media de 13 horas [297].

Independientemente de la dosis administrada, aproximadamente el 95% del naproxeno que se ingiere se elimina a través de la orina. Entre un 66 y un 92% se excreta como conjugados, mientras que el porcentaje restante lo hace como 6-O-desmetilnaproxeno (< 1%) o en su forma inalterada [300].

1.4.2.4. Diclofenaco

El diclofenaco (DIC) es un derivado del ácido fenil-acético, con un potente efecto antiinflamatorio y una potencia analgésica entre 5 y 15 veces superior a la del naproxeno y el ácido acetil salicílico. Cuando se administra por vía oral, el efecto analgésico comienza a los 15-30 minutos, con un pico máximo que se alcanza entre las 1-3 horas siguientes y con una duración de 4 a 6 horas [297].

La biotransformación del diclofenaco se produce, por una parte, por glucoronación de la molécula parental, y, principalmente, por metoxilación y por hidroxilación simple y múltiple, dando lugar a diversos metabolitos fenólicos, la mayoría de los cuales se convierten en glucorónidos conjugados [297].

El diclofenaco y sus metabolitos experimentan excreción urinaria y biliar. De este modo, aproximadamente el 65% de la dosis absorbida se

elimina a través de la orina como conjugados glucorónidos y como metabolitos fenólicos. Menos de un 1% de diclofenaco se ha detectado en la orina como sustancia inalterada. El 35% restante, se elimina en forma de metabolitos a través de la bilis con las heces [297].

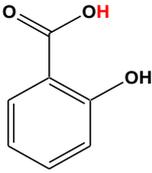
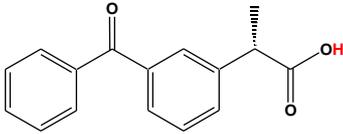
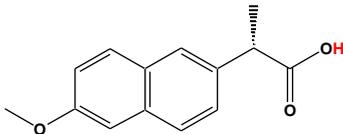
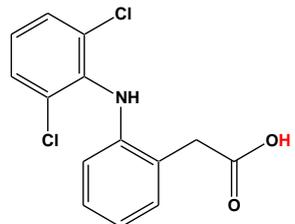
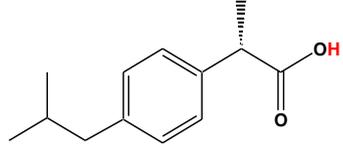
1.4.2.5. *Ibuprofeno*

El ibuprofeno (IBU) es un derivado del ácido propiónico con una capacidad analgésica y antiinflamatoria similar a la del ácido acetil salicílico. Cuando se administra por vía oral, el efecto analgésico comienza a los 30 minutos siguientes a la ingesta, con un pico máximo que se alcanza al cabo de 1-2 horas y con una duración del efecto de entre 6-8 horas [297].

Se metaboliza en el hígado por hidroxilación y carboxilación del grupo isobutilo, y sus metabolitos carecen de actividad farmacológica. La eliminación del ibuprofeno tiene lugar, principalmente, a nivel renal y se considera total al cabo de 24 horas. Aproximadamente, un 10% de este fármaco se excreta en la orina en forma inalterada entre 6 y 8 horas después de la ingesta. El 90% restante se excreta como metabolitos o alguna de sus formas conjugadas [301,302].

Todos ellos son ácidos débiles, derivados de ácidos carboxílicos aromáticos, con valores de pKa comprendidos entre 3 y 5 y que permanecen disociados a un pH dos unidades por encima de sus respectivos pKa. Se trata, además, de compuestos poco polares a pesar de que son relativamente solubles en agua [303]. En la Tabla 1.7 se muestran las principales características de estos compuestos así como la estructura molecular de los mismos.

Tabla 1.7. Estructura y características de los AINEs estudiados.

| Estructura | Características ^a |
|--|---|
|  <p data-bbox="392 640 620 674">Ácido salicílico (SAL)</p> | <p data-bbox="796 461 1222 488">Nombre IUPAC: 2-Hydroxybenzoic acid</p> <p data-bbox="860 495 1158 521">Fórmula molecular: C₇H₆O₃</p> <p data-bbox="880 528 1137 555">Número CAS: [69-72-7]</p> <p data-bbox="911 562 1107 589">PM: 138,12 g/mol</p> <p data-bbox="959 595 1059 622">pK_a: 3,01</p> <p data-bbox="943 629 1075 656">log P: 2,011</p> |
|  <p data-bbox="400 909 616 943">Ketoprofeno (KTP)</p> | <p data-bbox="783 730 1235 797">Nombre IUPAC: (RS)-2-(3-benzoylphenyl)-propionic acid</p> <p data-bbox="847 804 1171 831">Fórmula molecular: C₁₆H₁₄O₃</p> <p data-bbox="863 837 1155 864">Número CAS: [22071-15-4]</p> <p data-bbox="903 871 1115 898">PM: 254,281 g/mol</p> <p data-bbox="959 904 1059 931">pK_a: 4,23</p> <p data-bbox="943 938 1075 965">log P: 2,911</p> |
|  <p data-bbox="408 1189 608 1223">Naproxeno (NAX)</p> | <p data-bbox="743 1021 1278 1088">Nombre IUPAC: (+)-(S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl) propanoic acid</p> <p data-bbox="847 1095 1171 1122">Fórmula molecular: C₁₃H₁₈O₂</p> <p data-bbox="863 1128 1155 1155">Número CAS: [22204-53-1]</p> <p data-bbox="903 1162 1115 1189">PM: 206,26 g/mol</p> <p data-bbox="959 1196 1059 1223">pK_a: 4,84</p> <p data-bbox="943 1229 1075 1256">log P: 2,876</p> |
|  <p data-bbox="408 1559 608 1592">Diclofenaco (DIC)</p> | <p data-bbox="791 1335 1222 1402">Nombre IUPAC: 2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl) acetic acid</p> <p data-bbox="823 1408 1190 1435">Fórmula molecular: C₁₄H₁₁Cl₂O₂</p> <p data-bbox="855 1442 1158 1469">Número CAS: [15307-86-5]</p> <p data-bbox="895 1476 1107 1503">PM: 296,148 g/mol</p> <p data-bbox="959 1509 1059 1536">pK_a: 4,18</p> <p data-bbox="943 1543 1075 1570">log P: 4,548</p> |
|  <p data-bbox="408 1816 608 1850">Ibuprofeno (IBU)</p> | <p data-bbox="735 1648 1286 1715">Nombre IUPAC: (RS)-2-(4-(2-methylpropyl)phenyl) propanoic acid</p> <p data-bbox="847 1722 1171 1749">Fórmula molecular: C₁₄H₁₄O₃</p> <p data-bbox="863 1756 1155 1783">Número CAS: [15687-27-1]</p> <p data-bbox="903 1789 1115 1816">PM: 230,26 g/mol</p> <p data-bbox="959 1823 1059 1850">pK_a: 4,41</p> <p data-bbox="943 1856 1075 1883">log P: 3,50</p> |

^aDatos obtenidos de <http://www.chemspider.com/> y <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

REFERENCIAS

- [1] J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M.A. Bello-López, M. Ramos-Payán, New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review, *Anal. Chim. Acta* 905 (2016) 8-23.
- [2] H. Yan, H. Wang, Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1295 (2013) 1-15.
- [3] B.H. Fumes, M.R. Silva, F.N. Andrade, C.E.D. Nazario, F.M. Lanças, Recent advances and future trends in new materials for sample preparation, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 9-25.
- [4] J. Li, Y.B. Wang, K.Y. Li, Y.Q. Cao, S. Wu, L. Wu, Advances in different configurations of solid-phase microextraction and their applications in food and environmental analysis, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 141-152.
- [5] F. M. Musteata, J. Pawliszyn, Bioanalytical applications of solid-phase microextraction, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 26 (1) (2007) 36-45.
- [6] H. Kataoka, K. Saito, Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis, *J. Pharm. Biom. Anal.* 54 (2011) 926-950.
- [7] M. Sajid, K. Alhooshani, Dispersive liquid-liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: A review, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 167-182.
- [8] M. Ghambarian, Y. Yamini, A. Esrafil, Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications, *Microchim Acta* 177 (2012) 271-294.
- [9] J. Leea, H.K. Leea, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 8253-268.

[10] E.A. Souza Silva, S. Risticovic, J. Pawliszyn, Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 24-36.

[11] M. Szultka, P. Pomastowski, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski, Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3094-3105.

[12] S. Dadfarnia, A. Mohammad, H. Shabani, Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals-A review, *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 107-119.

[13] F. Augusto, E. Carasek, R. Gomes Costa Silva, S. Regina Rivellino, A. Domingues Batista, E. Martendal, New sorbents for extraction and microextraction techniques, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2533-2542.

[14] G. Theodoridis, E.H.M. Koster, G.J. Jong, Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 49-82.

[15] L. Yangcheng, L. Quan, L. Guangsheng, D. Youyuan, Directly suspended droplet microextraction. *Anal. Chim. Acta* 566 (2006) 259-264.

[16] H. Kataoka, New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 232-244.

[17] Y. Saito, K. Jinno, Miniaturized sample preparation combined with liquid phase separations, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 53-67.

[18] C. Nerin, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batlle, Critical evaluation of sample pretreatment techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 809-833.

[19] T. Hyötyläinen, Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 743-758.

[20] H. Kataoka, A. Ishizaki, Y. Nonaka, K. Saito, Developments and applications of capillary microextraction techniques: a review, *Anal. Chim. Acta* 655 (2009) 8-29.

[21] H. Kataoka, Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 339-364.

[22] S. Armenta, S. Garrigues, F.A.Esteve-Turrillas, M. de la Guardia, Green extraction techniques in green analytical chemistry, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 116 (2019) 248-253.

[23] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78-84.

[24] H. Kataoka, Recent Advances in Solid-Phase Microextraction and Related Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analysis, *Current Pharmac. Anal.* 1 (2005) 65-84.

[25] J. Pawliszyn, Sample Preparation: Quo Vadis?, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2543-2558.

[26] S. Codruta Cobzac, S. Gocan, Sample preparation for high performance liquid chromatography: recent progress, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 34 (2011) 1157-1267.

[27] C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, M. E. Torres-Padrón, J.J. Santana-Rodríguez, Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 30 (5) (2011) 731-748.

[28] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review, *Spectrochimica Acta Part B* 64 (2009) 1-15.

[29] D. Han, K.H. Row, Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples, *Microchim Acta* 176 (2012) 1-22.

- [30] B. Hashemi, P. Zohrabi, M. Shamsipur, Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples, *Talanta* 187 (2018) 337-347.
- [31] X.H. Zang, Q.H. Wu, M.Y. Zhang, G.H. Xi, Z. Wang, Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique, *Chin J Anal Chem* 37 (2) (2009) 161-168.
- [32] W. Peysson, E. Vulliet, Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1290 (2013) 46-61.
- [33] S. Tang, T. Qi, P.D. Ansah, J.C.N. Fouemina, W. Shen, C. Basheer, H.K. Lee, Single-drop microextraction, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 306-313.
- [34] E. Carasek, J. Merib, G. Mafra, D. Spudeit, A recent overview of the application of liquid-phase microextraction to the determination of organic micro-pollutants, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 203-209.
- [35] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145-2148.
- [36] C. Dietz, J. Sanz, C. Cámara, Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 183-192.
- [37] A. Peñalver, E. Pocerull, F. Borrull, R.M. Marcé, Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 18 (8) (1999) 557-568.
- [38] A. Spietelun, M. Pilarczyk, A. Kloskowski, J. Namiesnik, Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 4524-4537.
- [39] Y. Yang, J. Chen, Y.P. Shi, Recent developments in modifying polypropylene hollow fibers for sample preparation, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 64 (2015) 109-117.

[40] E.A. Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 224-235.

[41] E.A. Souza-Silva, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 249-274.

[42] E.A. Souza-Silva, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Ríos, E. Boyacı, B.J. Bojko, Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 236-248.

[43] R. Eisert, K. Levsen, Development of a prototype system for quasi-continuous analysis of organic contaminants in surface or sewage water based on in-line coupling of solid-phase microextraction to gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 59-65.

[44] R. Eisert, J. Pawliszyn, Design of automated solid-phase microextraction for trace analysis of organic compounds in aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 776 (1997) 293-303.

[45] H. Daimon, J. Pawliszyn, Effect of heating the interface on chromatographic performance of solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 34 (1997) 365-369.

[46] R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140-3147.

[47] A.A. Boyd-Boland, J.B. Pawliszyn, Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of alkylphenol ethoxylate surfactants in water, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1521-1529.

[48] S. Li, S.G. Weber, Determination of Barbiturates by Solid-Phase Microextraction and Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1217-1222.

[49] C.W. Whang, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction coupled to capillary electrophoresis, *Anal. Commun.* 35 (1998) 353-356.

[50] M.A. Azenha, P.J. Nogueira, A.F. Silva, Unbreakable solid-phase microextraction fibers obtained by sol-gel deposition on titanium wire, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2071-2074.

[51] S. Risticvic, V.H. Niri, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, Recent developments in solid-phase microextraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 781-795.

[52] H. Bagheri, H. Piri-Moghadam, M. Naderi, Towards greater mechanical, thermal and chemical stability in solid-phase microextraction, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 34 (2012) 126-139.

[53] A.A. Nuhua, C. Basheer, B. Saad, Liquid-phase and dispersive liquid-liquid microextraction techniques with derivatization: Recent applications in bioanalysis, *J. chromatogr. B* 879 (2011) 1180-1188.

[54] N. Cabaleiro, I. de la Calle, C. Bendicho, I. Lavilla, Current trends in liquid-liquid and solid-liquid extraction for cosmetic analysis: a review, *Anal. Methods* 5 (2013) 323-340.

[55] H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817-1821.

[56] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236-2240.

[57] Y. He, H.K. Lee, Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using conventional microsyringe, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634-4640.

[58] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle, *Anal. Chem.* 69 (1997) 235-239.

[59] A. Spietelun, Ł. Marcinkowski, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques, *Talanta* 119 (2014) 34-45.

[60] S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650-2656.

[61] G. Audunsson, Aqueous/aqueous extraction by means of a liquid membrane for sample cleanup and preconcentration of amines in a flow system, *Anal. Chem.* 58 (1986) 2714-2723.

[62] E. Thordarson, S. Pálmarsdóttir, L. Mathiasson, J. Å. Jönsson, Sample preparation using a miniaturized supported liquid membrane device connected on-line to packed capillary liquid chromatography, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2559-2563.

[63] A. Gjelstad, Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction and parallel artificial liquid membrane extraction, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 25-31.

[64] M. Ghambarian, Y. Yamini, A. Esrafil, N. Yazdanfar, M. Moradi, A new concept of hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction compatible with gas chromatography based on two immiscible organic solvents, *J Chromatogr A* 1217 (2010) 5652-5658.

[65] S. Cui, S. Tan, G. Ouyang, J. Pawliszyn, Automated polyvinylidene difluoride hollow fiber liquid-phase microextraction of flunitrazepam in plasma and urine samples for gas chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (12) (2009) 2241-2247.

[66] X. Sun, F. Zhu, J. Xi, T. Lu, H. Liu, Y. Tong, G. Ouyang, Hollow fiber liquid-phase microextraction as clean-up step for the determination of organophosphorus pesticides residues in fish tissue by gas chromatography coupled with mass spectrometry, *Marine Pollution Bulletin* 63 (5-12) (2011) 102-107.

[67] Z. Es'haghi, Determination of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples by in situ derivatization, continuous hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detector, *Anal. Chim. Acta* 641 (1-2) (2009) 83-88.

[68] S. Müller, M. Möder, S. Schrader, P. Popp, Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples, *J. Chromatogr. A* 985 (1-2) (2010) 99-106.

[69] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques, *J. Chromatogr. B* 817 (1) (2005) 3-12.

[70] T.S. Ho, T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 61-72.

[71] S. Shariati, Y. Yamini, A. Esrafil, Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC–UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics, *J. Chromatogr. B* 877 (4) (2009) 393-400.

[72] A. Bahrami, F. Ghamari, Y. Yamini, F.G. Shahna, A. Koolivand, Ion-pair-based hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of urinary benzene, toluene, and styrene metabolites, *J. Sep. Sci.* 41 (2) (2018) 501-508.

[73] J. Lv, X. Zhao, J. Ye, D. Liu, X. Chen, K. Bi, Hollow fiber-based liquid membrane microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of trimetazidine in human plasma, *Biomedical Chromatography* 27 (3) (2013) 292-298.

[74] F. Tajabadi, M. Ghambarian, Y. Yamini, N. Yazdanfar, Combination of hollow fiber liquid phase microextraction followed by HPLC-DAD and multivariate curve resolution to determine antibacterial residues in foods of animal origin, *Talanta* 160 (2016) 400-409.

[75] Y. Yamini, C.T. Reimann, A. Vatanara, J.Å. Jönsson, Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier, *J. Chromatogr. A* 1124 (1-2) (2006) 57-67.

[76] T.S. Ho, J.L.E. Reubsaet, H. S. Anthonsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport combined with liquid chromatography–mass spectrometry: New concept for the determination of polar drugs in a single drop of human plasma, *J. Chromatogr. A* 1072 (1) (2005) 29-36.

[77] P. Wieczorek, J.A. Joensson, L. Mathiasson, Concentration of amino acids using supported liquid membranes with di-2-ethylhexyl phosphoric acid as a carrier. *Anal. Chim. Acta* 346 (1997) 191-197.

[78] M. Mulugeta, N. Megers, Carrier-mediated extraction of bipyridilium herbicides across the hydrophobic liquid membrane, *Talanta* 64 (1) (2004) 101-108.

[79] A. Drapała, P. Wieczorek, Facilitated SLM extraction of peptides with D2EHPA as a carrier, *Desalination* 163 (1-3) (2004) 47-53.

[80] Z. Zhanga, C. Zhang, X. Su, M. Ma, B. Chen, S. Yao, Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine, *Anal. Chim. Acta* 621 (2) (2008) 185-192.

[81] M. Piriyaipittaya, S. Jayanta, S. Mitra, N. Leepipatpiboon, Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector, *J. Chromatogr. A* 1189 (1-2) (2008) 483-492.

[82] L. Zhang, X. Su, C. Zhang, L. Ouyang, Q. Xie, M. Ma, S. Yao, Extraction and preconcentration of β -blockers in human urine for analysis with high performance liquid chromatography by means of carrier-mediated liquid phase microextraction, *Talanta* 82 (3) (2010) 984-992.

[83] S. Yudthavorasit, C. ChiaoChan, N. Leepipatpiboon, Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Microchim. Acta* 172 (1-2) (2011) 39-49.

[84] B. Zargar, H. Parham, A. Hatamie, Hollow fiber liquid based microextraction of nalidixic acid in urine samples using Aliquat 336 as a carrier combined with High Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 54 (2016) 257-263.

[85] S. Andersen, T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, L. Tanum, H. Refsum, Stereospecific determination of citalopram and desmethylcitalopram by capillary electrophoresis and liquid-phase microextraction, *J Pharm Biomed Anal* 33 (2003) 263-273.

[86] L.S. de Jager, A.R.J. Andrews, Preliminary studies of a fast screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction (HFMSME), *Analyst* 126 (2001) 1298-1303.

[87] T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction, *J Chromatogr B* 760 (2001) 219-226.

[88] X. Jiang, H.K. Lee, Solvent bar microextraction, *Anal. Chem.* 76 (18) (2004) 5591-5596.

[89] N.J. Petersen, S.T. Foss, H. Jensen, S.H. Hansen, C. Skonberg, D. Snakenborg, J.K. Kutter, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electro membrane extraction with online ultraviolet and mass spectrometric detection, *Anal.Chem.* 83 (2011) 44-51.

[90] N.J. Petersen, J.S. Pedersen, N. N. Poulsen, H. Jensen, C. Skonberg, S.H. Hansen S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electromembrane extraction for monitoring drug metabolism in real time by electrospray ionization mass spectrometry, *Analyst* 137 (14) (2012) 3321-3327.

[91] N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, S.T. Foss, D. Snakenborg, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electro membrane extraction, *Microfluid. Nanofluid.* 9 (2010) 881-888.

[92] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, M.P. Parmer, S. Pedersen-Bjergaard, Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format, *Bioanalysis* 5 (2013) 1377-1385.

[93] M. Roldán-Piju, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel artificial liquid membrane extraction of acidic drugs from human plasma, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2811-2819.

[94] V. Pilařova, M. Sultani, K.S. Ask, L. Nováková, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, One-step extraction of polar drugs from plasma by parallel artificial liquid membrane extraction, *J. Chromatogr. B* 1043 (2017) 25-32.

[95] K.N. Olsen, K.S. Ask, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel artificial liquid membrane extraction of psychoactive analytes: a novel approach in therapeutic drug monitoring, *Bioanalysis* 10 (2018) 385-395.

[96] K.S. Ask, T. Bardakci, M.P. Parmer, T.G. Halvorsen, E.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel artificial liquid membrane extraction as an efficient tool for removal of phospholipids from human plasma, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 129 (2016) 229-236.

[97] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.

[98] A.V. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernandez-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes, *Trends Anal. Chem. TrAC* 29 (2010) 728-751.

[99] J. Zhang, H. Ma, Y. Wang, Application of dispersive liquid-liquid microextraction for determination of pharmaceuticals, *Northwest Pharm. J.* 4 (2012) 39.

[100] J. Regueiro, M. Llompart, C. Garcia-Jares, J.C. Garcia-Monteagudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 27-38.

[101] Y. Zhou, L. Han, J. Cheng, F. Guo, X. Zhi, H. Hu, et al., Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet for simultaneous analysis of diethofencarb and pyrimethanil in apple pulp and peel, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 1901-1906.

[102] X.C. Wang, B. Shu, S. Li, Z.G. Yang, B. Qiu, QuEChERS followed by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for organochlorine pesticides analysis in fish, *Talanta* 162 (2017) 90-97.

[103] M. Faraji, M. Noorani, B. Nasiri Sahneh, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe method followed by ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of trace amount of bisphenol A in canned foods, *Food Anal. Meth.* 10 (2017) 764-772.

[104] Ł. Marcinkowski, F. Pena-Pereira, A. Kloskowski, J. Namieśnik, Opportunities and shortcomings of ionic liquids in single-drop microextraction, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 153-168.

[105] E. Stanisław, A. Zgoła-Grzeškowiak, Liquid-phase microextraction techniques based on ionic liquids for preconcentration and determination of metals, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 61 (2014) 54-66.

[106] Sonia P.M. Ventura, Francisca A. eSilva, Maria V. Quental, D. Mondal, Mara G. Freire, João A.P. Coutinho, Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends, *Chem. Rev.* 117 (10) (2017) 6894-7052.

[107] Y. Yamini, M. Rezazadeh, S. Seidi, Liquid-phase microextraction-The different principles and configurations, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 264-272.

[108] A. Berduque, A. Sherburn, M. Ghita, R.A.W. Dryfe, D.W.M. Arrigan, Electrochemically modulated liquid-liquid extraction of ions. *Anal. Chem.* 77 (22) (2005) 7310-7318.

[109] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes, New concept for rapid sample preparation of biological fluids, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 183-190.

[110] V.K. Marothu, M. Gorrepati, R. Vusa, Electromembrane extraction-A novel extraction technique for pharmaceutical, chemical, clinical and environmental analysis, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 619-631.

[111] K.F. Seip, H. Jensen, M.H. Sønsteby, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction: Distribution or electrophoresis?, *Electrophoresis* 34 (5) (2013) 792-799.

[112] N. Drouin, P. Kubáň, S. Rudaz, S. Pedersen-Bjergaard, J. Schappler, Electromembrane extraction: Overview of the last decade, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 357-363.

[113] S. Pedersen-Bjergaard, C. Huang, A. Gjelstad, Electromembrane extraction-recent trends and where to go, *J. Pharm. Anal.* 7 (2017) 141-147.

[114] K.F. Seip, M. Faizi, C. Vergel, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Stability and efficiency of supported liquid membranes in electromembrane extraction-a link to solvent properties, *Anal Bioanal Chem* 406 (2014) 2151-2161.

[115] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction for pharmaceutical and biomedical analysis-Quo vadis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 97-107.

[116] S. Nojavan, H. Shaghghi, T. Rahmani, A. Shokri, M. Nasiri-Aghdam, Combination of electromembrane extraction and electro-assisted liquid-liquid microextraction: A tandem sample preparation method, *J. Chromatogr. A* 1563 (2018) 20-27.

- [117] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 921-928.
- [118] T.M. Middelthon-Bruer, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 753-759.
- [119] C. Huang, H. Jensen, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Mass transfer in electromembrane extraction-the link between theory and experiments, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 188-197.
- [120] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrical potential can drive liquid-liquid extraction for sample preparation in chromatography, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 934-941.
- [121] N.C. Dominguez, A. Gjelstad, A.M. Nadal, H. Jensen, N.J. Petersen, S.H. Hansen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Selective electromembrane extraction at low voltages based on analyte polarity and charge, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 48-54.
- [122] H.B. Dugstad, N.J. Petersen, H. Jensen, C. Gabel-Jensen, S.H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, Development and characterization of a small electromembrane extraction probe coupled with mass spectrometry for real-time and online monitoring of in vitro drug metabolism, *Anal Bioanal Chem* 406 (2014) 421-429.
- [123] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 29-34.
- [124] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 104-111.

[125] A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Recent developments in electromembrane extraction, *Anal. Methods* 5 (2013) 4549-4557.

[126] Y. Yamini, S. Seidi, M. Rezazadeh, Electrical field-induced extraction and separation techniques: Promising trends in analytical chemistry-A review, *Anal. Chim. Acta* 814 (2014) 1-22.

[127] M. Rezazadeh, Y. Yamini, S. Seidi, Electromembrane extraction of trace amounts of naltrexone and nalmefene from untreated biological fluids, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1143-1148.

[128] S.S. Davarani, A. Morteza-Najarian, S. Nojavan, A. Pourahadi, M.B. Abbasi, Two-phase electromembrane extraction followed by gas chromatography mass-spectrometry analysis, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 736-743.

[129] C. Huang, Z. Chen, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, X. Shen, Electromembrane extraction, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 95 (2017) 47-56.

[130] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, M.H. Koruni, Development of carbon-nanotube-assisted electromembrane extraction in the two-phase mode combined with GC for the determination of basic drugs, *J. Sep. Sci.* 37 (1-2) (2014) 85-91.

[131] C. Huang, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Organic solvents in electromembrane extraction: recent insights, *Rev. Anal. Chem.* 35 (2016) 169-183.

[132] L.E.E. Eibak, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Exhaustive electromembrane extraction of some basic drugs from human plasma followed by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 57 (2012) 33-38.

[133] M. Balchen, H. Jensen, L. Reubsaet, S. Pedersen-Bjergaard, Potential-driven peptide extractions across supported liquid membranes: Investigation of principal operational parameters, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1665-1672.

[134] S. Seidi, Y. Yamini, M. Rezazadeh, A. Esrafil, Low-voltage electrically enhanced microextraction as a novel technique for simultaneous extraction of acidic and basic drugs from biological fluids, *J. Chromatogr. A* 1243 (2012) 6-13.

[135] J. Lee, F. Khalilian, H. Bagheri, H.K. Lee, Optimization of some experimental parameters in the electro membrane extraction of chlorophenols from seawater, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7687-7693.

[136] H.R. Moazami, S. Nojavan, P. Zahedi, S.S.H. Davarani, Electronic simulation of the supported liquid membrane in electromembrane extraction systems: Improvement of the extraction by precise periodical reversing of the field polarity, *Anal. Chim. Acta* 841 (2014) 24-32.

[137] R.W. Taft, M.J. Kamlet, The solvatochromic comparison method. 2. The alpha-scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 2886-2894.

[138] M.J. Kamlet, J.L.M. Abboud, M.H. Abraham, R.W. Taft, Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, π^* , α and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation, *J. Org. Chem.* 48 (17) (1983) 2877-2887.

[139] M. Balchen, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 220-225.

[140] C. Román-Hidalgo, M.J. Martín-Valero, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, M.A. Bello-López, New nanostructured support for carrier-mediated electromembrane extraction of high polar compounds, *Talanta* 162 (2017) 32-37.

[141] S. Nojavan, T. Rahmani, S. Mansouri, Selective Determination of Chromium(VI) in Industrial Wastewater Samples by Micro-Electromembrane Extraction Combined with Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *Water, Air and Soil Pollution* 229 (2018) 89.

[142] S.S.H. Davarani, A. Pourahadi, S. Nojavan, M.H. Banitaba, M.N. Aghdam, Electro membrane extraction of sodium diclofenac as an acidic compound from wastewater, urine, bovine milk, and plasma samples and quantification by high-performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 722 (2012) 55-62.

[143] J.N. Sun, Y.P. Shi, J. Chen, Development of ionic liquid based electromembrane extraction and its application to the enrichment of acidic compounds in pig kidney tissues, *RSC Adv.* 5 (2015) 37682-37690.

[144] J.N. Sun, J. Chen, Y.P. Shi, Ionic liquid-based electromembrane extraction and its comparison with traditional organic solvent based electromembrane extraction for the determination of strychnine and brucine in human urine *J. Chromatogr. A* 1352 (2014) 1-7.

[145] M. Forough, K. Farhadi, A. Eyshi, R. Molaei, H. Khalili, V.J. Kouzegaran, A. Abbas Matin, Rapid ionic liquid-supported nano-hybrid composite reinforced hollow-fiber electromembrane extraction followed by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis: an effective approach for extraction and quantification of Imatinib mesylate in human plasma, *J. Chromatogr. A* 1516 (2017) 21-34.

[146] Y.A. Asl, Y. Yamini, S. Seidi, M. Rezazadeh, Simultaneous extraction of acidic and basic drugs via on-chip electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 937 (2016) 61-68.

[147] A. Gjelstad, H. Jensenb, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Kinetic aspects of hollow fiber liquid-phase microextraction and electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 742 (2012) 10-16.

[148] C. Román-Hidalgo, M.J. Martín-Valero, R. Fernández-Torres, M.A. Bello-López, Use of Polymer Inclusion Membranes (PIMs) as support for electromembrane extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and highly polar acidic drugs, *Talanta* 179 (2018) 601-607.

[149] A. Slampová, P. Kubáň, P. Boček, Quantitative aspects of electrolysis in electromembrane extractions of acidic and basic analytes, *Anal. Chim. Acta* 887 (2015) 92-100.

[150] Y.A. Asl, Y. Yamini, S. Seidi, A novel approach to the consecutive extraction of drugs with different properties via on chip electromembrane extraction, *Analyst* 141 (1) 2016 311-318.

[151] A. Slampová, P. Kubáň, P. Boček, Additional considerations on electrolysis in electromembrane extraction, *J. Chromatogr. A* 1429 (2016) 364-368.

[152] P. Kubáň, P. Boček, The effects of electrolysis on operational solutions in electromembrane extractions: the role of acceptor solution, *J. Chromatogr. A* 1398 (2015) 11-19.

[153] S. Asadi, S. Nojavan, Two-step voltage dual electromembrane extraction: a new approach to simultaneous extraction of acidic and basic drugs, *Anal. Chim. Acta* 923 (2016) 24-32.

[154] A. Gjelstad, T.M. Andersen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields, *J. Chromatogr. A* 1157 (1-2) (2007) 38-45.

[155] S. Seidi, Y. Yamini, A. Heydari, M. Moradi, A. Esrafil, M. Rezazadeh, Determination of thebaine in water samples, biological fluids, poppy capsule, and narcotic drugs, using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography analysis, *Anal. Chim. Acta* 701 (2018) 181-188.

[156] T. Rahmani, A. Rahimi, S. Nojavan, Study on electrical current variations in electromembrane extraction process: Relation between extraction recovery and magnitude of electrical current, *Anal. Chim. Acta* 903 (2016) 81-90.

[157] L. Fotouhi, S. Seidi, Y. Yamini, E. Hosseini, Evaluation of pulsed electromembrane extraction for the analysis of diclofenac and mefenamic acid in biological fluids, *Anal. Methods* 7 (2015) 2848-2854.

[158] S. Seidi, Y. Yamini, M. Rezazadeh, Electrically enhanced microextraction for highly selective transport of three β -blocker drugs, *J. Pharm. Biom. Anal.* 54 (2011) 926-950

[159] N.J. Petersen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Electromembrane extraction from biological fluids, *Anal. Sci.* 56 (5) (2011) 859-866.

[160] H. Tabani, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, Simultaneous determination of acidic and basic drugs using dual hollow fiber electromembrane extraction combined with CE, *Electrophoresis* 34 (2013) 269-276.

[161] L. Arjomandi-Behzad, Y. Yamini, M. Rezazadeh, Pulsed electromembrane method for simultaneous extraction of drugs with different properties, *Anal. Biochem.* 438 (2013) 136-143.

[162] M. Safari, S. Nojavan, S.S.H. Davarani, A. Morteza-Najarian, Speciation of chromium in environmental samples by dual electromembrane extraction system followed by high performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 789 (2013) 58-64.

[163] S. Nojavan, S. Asadi, Electromembrane extraction using two separate cells: a new design for simultaneous extraction of acidic and basic compounds, *Electrophoresis* 37 (2016) 587-594.

[164] M.H. Koruni, H. Tabani, H. Gharari, A.R. Fakhari, An all-in-one electromembrane extraction: development of an electro-membrane extraction method for the simultaneous extraction of acidic and basic drugs with a wide range of polarities, *J. Chromatogr. A* 1361 (2014) 95-99.

- [165] Y.A. Asl, Y. Yamini, S. Seidi, H. Amanzadeh, Dynamic electromembrane extraction: automated movement of donor and acceptor phases to improve extraction efficiency, *J. Chromatogr. A* 1419 (2015) 10-18.
- [166] N. Drouin, S. Rudaz, J. Schappler, Dynamic-electromembrane extraction: a technical development for the extraction of neuropeptides, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5308-5315.
- [167] M.D.R. Payán, B. Li, N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, Nano-electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 785 (2013) 60-66.
- [168] D. Fuchs, H. Jensen, S. Pedersen-Bjergaard, C. Gabel-Jensen, S.H. Hansen, N.J. Petersen, Real time extraction kinetics of electro membrane extraction verified by comparing drug metabolism profiles obtained from a flow-flow electro membrane extraction-mass spectrometry system with LC-MS, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5774-5781.
- [169] L. Xu, P.C. Hauser, H.K. Lee, Electro membrane isolation of nerve agent degradation products across a supported liquid membrane followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 17-22.
- [170] C. Basheer, J. Lee, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, K.E., H.K. Lee, Simultaneous extraction of acidic and basic drugs at neutral sample pH: A novel electro-mediated microextraction approach; *Journal of Chromatogr. A* 1217 (2010) 6661-6667.
- [171] N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Drop-to-drop microextraction across a supported liquid membrane by an electrical field under stagnant conditions, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1496-1502.
- [172] F. Zarghampour, Y. Yamini, M. Baharfar, M. Faraji, Simultaneous extraction of acidic and basic drugs via on-chip electromembrane extraction using a single-compartment microfluidic device, *Analyst* 144 (2019) 1159-1166.

[173] W.A. Khan, Y. Yamini, M. Baharfar, M. Balal Arain, A new microfluidic-chip device for selective and simultaneous extraction of drugs with various properties, *New J. Chem.* 43 (2019) 9689-9695.

[174] A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction: a new technique for accelerating bioanalytical sample preparation, *Bioanalysis* 3 (2011) 787-797.

[175] C. Huang, L.E.E. Eibak, A. Gjelstad, X. Shen, R. Trones, H. Jensen, S. Pedersen Bjergaard, Development of a flat membrane based device for electromembrane extraction: A new approach for exhaustive extraction of basic drugs from human plasma, *J. Chromatogr. A* 1326 (2014) 7-12.

[176] C. Huang, A. Gjelstad, K.F. Seip, H. Jensen, S. Pedersen-Bjergaard, Exhaustive and stable electromembrane extraction of acidic drugs from human plasma, *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 81-87.

[177] C. Huang, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Exhaustive extraction of peptides by electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 853 (2015) 328-334.

[178] C.R. Hidalgo, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, M.J. Martín-Valero, M.A. Bello-López, Agar films containing silver nanoparticles as new supports for electromembrane extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1519-1525.

[179] C. Román-Hidalgo, G. López-Pérez, M.J. Martín-Valero, M.A. Bello-López, Chitosan tailor-made membranes as biopolymeric support for electromembrane extraction, *Talanta* 199 (2018) 290-295.

[180] S.S.H. Davarani, N. Sheikhi, S. Nojavan, R. Ansari, S. Mansori, Electromembrane extraction of heavy metal cations from aqueous media based on flat membrane: method transfer from hollow fiber to flat membrane, *Anal. Methods* 7 (2015) 2680-2686.

[181] L.E.E. Eibak, M.P. Parmer, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel electromembrane extraction in a multiwell plate, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 431-440.

[182] L.E.E. Eibak, K.E. Rasmussen, E.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel electromembrane extraction in the 96-well format, *Anal. Chim. Acta* 828 (2014) 46-52.

[183] N. Drouin, J.F. Mandscheff, S. Rudaz, J. Schappler, Development of a new extraction device based on parallel-electromembrane extraction, *Anal. Chem.* 89 (2017) 6346-6350.

[184] R.J. Raterink, P.W. Lindenburg, R.J. Vreeken, T. Hankemeier, Three-phase electroextraction: a new (online) sample purification and enrichment method for bioanalysis, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7762-7768.

[185] P. Kubáň, P. Boček, Micro-electromembrane extraction across free liquid membranes. Instrumentation and basic principles, *J. Chromatogr. A* 1346 (2014) 25-33.

[186] P. Kubáň, P. Boček, Micro-electromembrane extraction across free liquid membranes. Extractions of basic drugs from undiluted biological samples, *J. Chromatogr. A* 1337 (2014) 32-39.

[187] P. Kubáň, A. Šlampová, Direct analysis of free aqueous and organic operational solutions as a tool for understanding fundamental principles of electromembrane extraction, *Anal. Chem.* 89 (23) (2017) 12960-12967.

[188] P. Kubáň, P. Boček, Simultaneous micro-electromembrane extractions of anions and cations using multiple free liquid membranes and acceptor solutions, *Anal. Chim. Acta* 908 (2016) 113-120.

[189] P. Kubáň, Salt Removal from Microliter Sample Volumes by Multiple Phase Microelectromembrane Extractions Across Free Liquid Membranes, *Anal. Chem.* 89 (16) (2017) 8476-8483.

[190] P. Kubáň, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Micro-electromembrane extraction using multiple free liquid membranes and acceptor solutions-Towards selective extractions of analytes based on their acid-base strength, *Anal. Chim. Acta* 943 (2016) 64-73.

[191] P.W. Lindenburg, R. Seitzinger, F.W. Tempels, U.R. Tjaden, J. van der Greef, T. Hankemeier, Online capillary liquid-liquid electroextraction of peptides as fast pre-concentration prior to LC-MS, *Electrophoresis* 31 (2010) 3903-3912.

[192] P.W. Lindenburg, F.W. Tempels, U.R. Tjaden, J. van der Greef, T. Hankemeier, Online large-volume electroextraction coupled to liquid chromatography mass spectrometry to improve detection of peptides, *J. Chromatogr. A* 1249 (2012) 17-24.

[193] A. Šlampová, P. Kubáň, Two-phase micro-electromembrane extraction across free liquid membrane for determination of acidic drugs in complex samples, *Anal. Chim. Acta* 1048 (2019) 58-65.

[194] I.J. Kjelsen, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Low-voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples, *Journal Chromatogr. A* 1180 (2008) 1-9.

[195] M. Rezazadeh, Y. Yamini, S. Seidi, A. Esrafil, Pulsed electromembrane extraction: A new concept of electrically enhanced extraction, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 214-218.

[196] M. Rezazadeh, Y. Yamini, S. Seidi, L. Arjomandi-Behzada, Voltage-step pulsed electromembrane as a novel view of electrical field-induced liquid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A* 1324 (2014) 21-28.

[197] A. Šlampová, P. Kubáň, P. Boček, Electromembrane extraction using stabilized constant d.c. electric current-a simple tool for improvement of extraction performance, *J. Chromatogr. A* 1234 (2012) 32-37.

[198] S. Seidi, Y. Yamini, M. Rezazadeh, Combination of electromembrane extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatographic analysis as a fast and sensitive technique for determination of tricyclic antidepressants, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 913-914 (2013) 138–146.

[199] L. Guo, H.K. Lee, Electro membrane extraction followed by low density solvent based ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with derivatization for determining chlorophenols and analysis by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1243 (2012) 14-22.

[200] M. Rezazadeh, Y. Yamini, S. Seidi, B. Ebrahimpor, Electromembrane surrounded solid phase microextraction: a novel approach for efficient extraction from complicated matrices, *J. Chromatogr. A* 1280 (2013) 16-22.

[201] A.R. Fakhari, A. Sahragard, H. Ahmar, H. Tabani, A novel platform sensing based on combination of electromembrane-assisted solid phase microextraction with linear sweep voltammetry for the determination of tramadol, *J. Electroanal. Chem.* 747 (2015) 12–19.

[202] H. Abedi, H. Ebrahimzadeh, Electromembrane-surrounded solid phase microextraction coupled to ion mobility spectrometry for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a rapid screening method in complicated matrices, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 1358–1364.

[203] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, X. Shen, S. Pedersen-Bjergaard, Combination of electromembrane extraction and liquid phase microextraction in a single step: simultaneous group separation of acidic and basic drugs, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6951-6957.

[204] H.R. Moazami, S.S.H. Davarani, M. Abrari, A. Elahi, Electromembrane Extraction Using a Round-Headed Platinum Wire as the Inner Electrode: A Simple and Practical Way to Enhance the Performance of Extraction, *Chromatographia* 81 (2018) 1023-1033.

[205] Y.A. Asl, Y. Yamini, M. Rezazadeh, S. Seidi, Electromembrane extraction using cylindrical electrode: a new view for augmentation of extraction efficiency, *Anal. Methods* 7 (2012) 197-204.

[206] H.R. Moazami, S.S.H. Davarani, J. Mohammadi, S. Nojavan, M. Abrari, The effect of electric field geometry on the performance of electromembrane extraction systems: footprints of a third driving force along with migration and diffusion, *Anal. Chim. Acta* 891 (2015) 151-159.

[207] S.S.H. Davarani, H.R. Moazami, E. Memarian, S. Nojavan, Electromembrane extraction through a virtually rotating supported liquid membrane, *Electrophoresis* 37 (2) (2016) 339-346.

[208] S. Asadi, H. Tabani, K. Khodaei, F. Asadian, S. Nojavan, Rotating electrode in electro membrane extraction: a new and efficient methodology to increase analyte mass transfer. *RSC Adv.* 6 (2016) 101869-101879.

[209] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, Development and application of carbon nanotubes assisted electromembrane extraction (CNTs/EME) for the determination of buprenorphine as a model of basic drugs from urine samples, *Anal. Chim. Acta* 767 (2013) 75-80.

[210] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, H. Ahmar, A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using carbon nanotube reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked plasma, urine, breast milk and wastewater samples. *J. Chromatogr. A* 1285 (2013) 1-6.

[211] X.Y. Song, J. Chen, Y.P. Shi, Electromembrane extraction based on carbon nanotubes reinforced hollow fiber for the determination of plant hormones, *New J. chem.* 39 (2015) 9191-9199.

[212] M. Ramos-Payán, R. Fernández-Torres, J.L. Pérez-Bernal, M. Callejón-Mochón, M.A. Bello-López, A novel approach for electromembrane extraction based on the use of silver nanometallic-decorated hollow fibers, *Anal. Chim. Acta* 849 (2014) 7-11.

[213] Z. Tahmasebi, S.S.H. Davarani, A.A. Asgharinezhad, Highly efficient electrochemical determination of propylthiouracil in urine samples after selective electromembrane extraction by copper nanoparticles decorated hollow fibers, *Biosens. Bioelectron.* 114 (2018) 66-71.

[214] N.A. Mamat, H.H. See, Development and evaluation of electromembrane extraction across a hollow polymer inclusion membrane, *J. Chromatogr. A* 1406 (2015) 34-39.

[215] N.A. Mamat, H.H. See, Simultaneous electromembrane extraction of cationic and anionic herbicides across hollow polymer inclusion membranes with a bubbleless electrode, *J. Chromatogr. A* 1504 (2017) 9-16.

[216] H. Tabani, S. Asadi, S. Nojavan, M. Parsa, Introduction of agarose gel as a green membrane in electromembrane extraction: An efficient procedure for the extraction of basic drugs with a wide range of polarities, *J. Chromatogr. A* 1497 (2017) 47-55.

[217] S.Sedehi, H.Tabani, S. Nojavan, Electro-driven extraction of polar compounds using agarose gel as a new membrane: Determination of amino acids in fruit juice and human plasma samples, 179 (2018) 318-325.

[218] H.H. See, P.C. Hauser, Electric Field-Driven Extraction of Lipophilic Anions across a Carrier-Mediated Polymer Inclusion Membrane, *Anal. Chem.* 83 (19) (2011) 7507-7513.

[219] S. Nojavan, M. Sirani, S. Asadi, Investigation of the continuous flow of the sample solution on the performance of electromembrane extraction: comparison with conventional procedure, *J. Sep. Sci.* 40 (19) (2017)3889-3897.

[220] S. Yaripour, A. Mohammadi, I. Esfanjani, R.B. Walker, S. Nojavan, Quantitation of zolpidem in biological fluids by electro-driven microextraction combined with HPLC-UV analysis, *EXCLI J.* 17 (2018) 349-361.

[221] L.E.E. Eibak, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Kinetic electromembrane extraction under stagnant conditions-fast isolation of drugs from untreated human plasma, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5050-5056.

[222] R.E. Jamt, A. Gjelstad, L.E.E. Eibak, E.L. Oiestad, A.S. Christophersen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of stimulating drugs from undiluted whole blood, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 27-36.

[223] M. Dvořák, K.F. Seip, S. Pedersen-Bjergaard, P. Kubáň, Semi-automated set-up for exhaustive micro-electromembrane extractions of basic drugs from biological fluids, *Anal. Chim. Acta*, 1005 (2018) 34-42.

[224] Z. Aladaghlo, A.R. Fakhari, K.S. Hasheminasab, Application of electromembrane extraction followed by corona discharge ion mobility spectrometry analysis as a fast and sensitive technique for determination of tricyclic antidepressants in urine samples, *Microchem. J.* 129 (2016) 41-48.

[225] L.E.E. Eibak, A.B. Hegge, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Alginate and chitosan foam combined with electromembrane extraction for dried blood spot analysis, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8783-8789.

[226] L. Fotouhi, Y. Yamini, S. Molaei, S. Seidi, Comparison of conventional hollow fiber based liquid phase microextraction and electromembrane extraction efficiencies for the extraction of ephedrine from biological fluids; *Journal of Chromatography A*, 218 (2011) 8581-8586.

[227] L. Fotouhi, Y. Yamini, R. Hosseini, M. Rezazadeh, Determination of phenazopyridine in biological fluids using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography *Can. J. Chem.* 93 (7) (2015) 702-707.

[228] M. Eskandari, Y. Yamini, L. Fotouhi, S. Seidi, Microextraction of mebendazole across supported liquid membrane forced by pH gradient and electrical field, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 1173-1179.

[229] H. Tabani, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, H. Gharari Alibabaou, Electrically assisted liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for quantification of propranolol enantiomers in human body fluids, *Chirality* 26 (2014) 260-267.

[230] A. Rouhollahi, M. Kouchaki, S. Seidi, Electrically stimulated liquid phase microextraction combined with differential pulse voltammetry: a new and efficient design for in situ determination of clozapine from complicated matrices, *RSC Adv.* 6 (2016) 12943-12952.

[231] H. Ahmar, A.R. Fakhari, H. Tabani, A. Shahsavani, Optimization of electromembrane extraction combined with differential pulse voltammetry using modified screen-printed electrode for the determination of sufentanil, *Electrochim. Acta* 96 (2013) 117-123.

[232] A.R. Fakhari, M.H. Koruni, H. Ahmar, A. Shahsavani, S.K. Movahed, Electrochemical determination of dextromethorphan on reduced graphene oxide modified screen-printed electrode after electromembrane extraction, *Electroanalysis* 26 (2014) 521-529.

[233] S. Nojavan, A.R. Fakhari, Electro membrane extraction combined with capillary electrophoresis for the determination of amlodipine enantiomers in biological samples, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3231-3238.

[234] Z. Mofidi, P. Norouzi, S. Seidi, M. Reza Ganjali, Efficient design for in situ determination of amlodipine in whole blood samples using fast Fourier transform stripping square wave voltammetry after preconcentration by electromembrane extraction, *New J. Chem.* 41 (2017) 13567-13575.

[235] P. Kubáň, P. Boček, Capillary electrophoresis with capacitively coupled contact-less conductivity detection: a universal tool for the determination of supported liquid membrane selectivity in electromembrane extraction of complex samples, *J. Chromatogr. A* 1267 (2012) 96-101.

[236] S.S. Davarani, A.M. Najarian, S. Nojavan, M.A. Tabatabaei, Electromembrane extraction combined with gas chromatography for quantification of tricyclic antidepressants in human body fluids, *Anal. Chim. Acta* 725 (2012) 51-56.

[237] A.R. Fakhari, H. Tabani, S. Nojavan, H. Abedi, Electromembrane extraction combined with cyclodextrin-modified capillary electrophoresis for the quantification of trimipramine enantiomers, *Electrophoresis* 33 (2012) 506-515.

[239] A.R. Fakhari, H. Tabani, H. Behdad, S. Nojavan, M. Taghizadeh, Electrically enhanced microextraction combined with maltodextrin-modified capillary electrophoresis for quantification of tolterodine enantiomers in biological samples, *Microchem. J.* 106 (2013) 186-193.

[239] Y.A. Asl, Y.Yamini, S. Seidi, B. Ebrahimpour, A new effective on chip electromembrane extraction coupled with high performance liquid chromatography for enhancement of extraction efficiency, *Anal. Chim. Acta* 898 (2015) 42-49.

[240] K.M. Ara, F. Raofie, S. Seidi, Simultaneous extraction and determination of trace amounts of olanzapine and fluoxetine from biological fluids: comparison of conventional hollow fiber supported liquid phase microextraction and pulsed electrically assisted liquid-phase microextraction techniques, *Anal. Methods* 7 (2015) 7840-7851.

[241] P. Zahedi, S.S. Davarani, H.R. Moazami, S. Nojavan, Surfactant assisted pulsed two-phase electromembrane extraction followed by GC analysis for quantification of basic drugs in biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 117 (2016) 485-491.

[242] C.P. Lodoen, L.E. Eibak, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, T. Andersen, A. Gjelstad, Storage of oral fluid as dried spots on alginate and chitosan foam-a new concept for oral fluid collection, *Bioanalysis* 5 (2013) 317-325.

[243] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of polar basic drugs from plasma with pure bis (2-ethylhexyl) phosphite as supported liquid membrane, *Anal. Chim. Acta* 934 (2016) 80-87.

[244] A.R. Fakhari, S. Asadi, H.M. Kosalar, A. Sahragard, A. Hashemzadeh, M.M. Amini, Metal-organic framework enhanced electromembrane extraction-a conceptual study using basic drugs as model substances, *Anal. Methods* 9 (2017) 5646-5652.

[245] M. Balchen, A.G. Hatterud, L. Reubsaet, S. Pedersen-Bjergaard, Fundamental studies on the electrokinetic transfer of net cationic peptides across supported liquid membranes, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 186-195.

[246] Y. Yamini, A. Pourali, S. Seidi, M. Rezazadeh, Electromembrane extraction followed by high performance liquid chromatography: an efficient method for extraction and determination of morphine, oxymorphone, and methylmorphine from urine samples, *Anal. Methods* 6 (2014) 5554-5565.

[247] M. Baharfar, Y. Yamini, S. Seidi, M. Karami, Quantitative analysis of clonidine and ephedrine by a microfluidic system: on-chip electromembrane extraction followed by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 1068-1069 (2017) 313-321.

[248] M. Karami, Y. Yamini, Y.A. Asl, M. Rezazadeh, On-chip pulsed electromembrane extraction as a new concept for analysis of biological fluids in a small device, *J. Chromatogr. A* 1527 (2017) 1-9.

[249] S. Seidi, Y. Yamini, T. Baheri, R. Feizbakhsh, Electrokinetic extraction on artificial liquid membranes of amphetamine-type stimulants from urine samples followed by high performance liquid chromatography analysis, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3958-3965.

[250] S. Seidi, Y. Yamini, A. Saleh, M. Moradi, Electromembrane extraction of levamisole from human biological fluids, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 585-593.

[251] H. Ahmar, H. Tabani, M.H. Koruni, S.S.H. Davarani, A.R. Fakhari, A new platform for sensing urinary morphine based on carrier assisted electromembrane extraction followed by adsorptive stripping voltammetric detection on screen-printed electrode, *Biosen. Bioelectron.* 54 (2014) 189-194.

[252] A. Fashi, F. Khanban, M.R. Yaftian, A. Zamani, The cooperative effect of reduced graphene oxide and Triton X-114 on the electromembrane microextraction efficiency of Pramipexole as a model analyte in urine samples, *Talanta* 162 (2017) 210-217.

[253] Y. Imoto, H. Nishiyama, Y. Nakamura, S.I. Ohira, K. Toda, Electrodialytic extraction of anionic pharmaceutical compounds from a single drop of whole blood using a supported liquid membrane, *Talanta* 181 (2018) 197-203.

[254] S. Yaripour, M. Zaher, A. Mohammadi, An electromembrane extraction–HPLC-UV analysis for the determination of valproic acid in human plasma, *J. Chin. Chem. Soc.* 65 (8) (2018) 989-994.

[255] Z. Mofidi, P. Norouzi, S. Seidi, M.R. Ganjali, Determination of diclofenac using electromembrane extraction coupled with stripping FFT continuous cyclic voltammetry, *Anal. Chim. Acta* 972 (2017) 38-45.

[256] Z. Mofidi, P. Norouzi, B. Larijani, S. Seidi, M.R. Ganjali, M. Morshedi, Simultaneous determination and extraction of ultra- trace amounts of estradiol valerate from whole blood using FFT square wave voltammetry and low-voltage electrically enhanced microextraction techniques *J. Electroanal. Chem.* 813 (2018) 83-91.

[257] A. Atarodi, M. Chamsaz, A.Z. Moghaddam, H. Tabani, Introduction of high nitrogen doped graphene as a new cationic carrier in electromembrane extraction, *Electrophoresis* 37 (2016) 1191-1200.

[258] E. Fernández, L. Vårdal, L. Vidal, A. Canals, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Complexation-mediated electromembrane extraction of highly polar basic drugs-a fundamental study with catecholamines in urine as model system, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (17) (2017) 4215-4223.

[259] L. Strieglerová, P. Kubáň, P. Boček, Electromembrane extraction of amino acids from body fluids followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *J. Chromatogr. A* 1238 (37) (2011) 6248-6255.

[260] M.Rezazadeh, Y. Yamini, S. Seidi, A. Esrafil, One-way and two-way pulsed electromembrane extraction for trace analysis of amino acids in foods and biological samples, *Anal. Chim. Acta* 773 (2013) 52-59.

[261] M. Balchen, H. Lund, L. Reubsaet, S. Pedersen-Bjergaard, Fast, selective, and sensitive analysis of low-abundance peptides in human plasma by electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 716 (2012) 16-23.

[262] M. Balchen, T.G. Halvorsen, L. Reubsaet, S. Pedersen-Bjergaard, Rapid isolation of angiotensin peptides from plasma by electromembrane extraction, *J.Chromatogr. A* 1216 (2009) 6900-6905.

[263] S. Nojavan, T. Bidarmanesh, A. Mohammadi, S. Yaripour, Electromembrane extraction of gonadotropin-releasing hormone agonists from plasma and wastewater samples, *Electrophoresis*, 37 (2016) 826-833.

[264] C. Basheer, S.H. Tan, H.K. Lee, Extraction of lead ions by electromembrane isolation; *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 14-18.

[265] L. Strieglerová, P. Kubáň , P. Boček, Rapid and simple pretreatment of human body fluids using electromembrane extraction across supported liquid membrane for capillary electrophoretic determination of lithium, *Electrophoresis* 32 (2011) 1182-1189.

[266] A. Fashi, M.R. Yaftian, A. Zamani, Electromembrane-microextraction of bismuth in pharmaceutical and human plasma samples: optimization using response surface methodology, *Microchem. J.* 130 (2017) 71-78.

[267] M. Silva, C Mendiguchía, C. Moreno, P. Kubáň, Electromembrane extraction and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection: Multi-extraction capabilities to analyses trace metals from saline samples, *Electrophoresis* 39 (16) (2018) 2152-2159.

[268]. María Jesús García Galán. Estudio de la presencia y comportamiento de las sulfamidas en el medio ambiente, Tesis Doctoral (2012), Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

[269] Mario Olías Consentino, Desarrollo, optimización y validación de métodos analíticos para la determinación de antibióticos en productos pesqueros de interés comercial, Tesis Doctoral (2009), Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

[270] T. Heberer, Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data, *Toxicol. Lett.* 131 (2002) 5-17.

[271] L. Ascar, I. Ahumada, A. López, F. Quintanilla, K. Leiva, Nonsteroidal anti-inflammatory drug determination in water samples by HPLC-DAD under isocratic conditions, *J Brazilian Chem. Soc.* 24 (2013) 1160-1166.

[272] J. Kumirska, P. Łukaszewicz, M. Caban, N. Migowska, A. Plenis, A. Białk-Bielińska, M. Czerwicka, F.Qi, S. Piot, Determination of twenty pharmaceutical contaminants in soil using ultrasound-assisted extraction with gas chromatography-mass spectrometric detection, *Chemosphere* 232 (2019) 232-242.

[273] C. Hignite, D.L. Azarnoff, Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent., *Life Sci.* 20 (1977) 337-341.

[274] C.K. Ong, P. Lirk, C.H. Tan, R.A. Seymour, An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Clin. Med. Res.* 5 (2007) 19-34.

[275] C.G. Daughton, T.A. Ternes, Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 907.

[276] J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. Goodman-Gilman, Analgésicos antipiréticos, antiinflamatorios y fármacos que se utilizan en el tratamiento de la gota. Goodman & Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica, 27 (1996).

[277] A. Michael, J. Monaco, Frequently Prescribed Medications, Johns and Bartlett Learning, Sudbury (2010).

[278] C.H. Lee, Y. Shin, M.W. Nam, K.M. Jeong, J.A. Lee, A new analytical method to determine non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water using in situ derivatization combined with ultrasound-assisted emulsification microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 129 (2014) 552-559.

[279] T. Hu, T. Peng, X. J. Li, D.D. Chen, H.H. Dai, X.J. Deng, Z.F. Yue, G.M. Wang, J.Z. Shen, X. Xia, S.Y. Ding, Y.N. Zhou, A.L. Zhu, H.Y. Jiang, Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1219 (2012) 104-113.

[280] P. Maslo, R. O. Cervera, N. Casals, N. Las dolencias de la espalda, Ed. Paidotribo (2001).

[281] M.E. Godersky, L.K. Vercammen, A.S. Ventura, A.Y. Walley, R. Saitz, Identification of non-steroidal anti-inflammatory drug use disorder: a case report, *Addict. Behav.* 70 (2017) 61-64.

[282] L.J. Crofford, *Nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Em: E.D. Harris, R.C. Budd, G.S. Firestein, M.C. Genovese, J.S. Sargent, S. Ruddy S, C.B. Sledge editors. *Kelley's Textbook of Rheumatology*, Seventh edition. Philadelphia: Elsevier Saunders (2005) 39-858.

[283]. J. Ivorra, J. Rosas, G. Santos, M. García-Carrasco. *Antiinflamatorios no esteroideos*. En: M. Ramos-Casals, M. García-Carrasco, J. Rosas editores. *Enfermedades autoinmunes sistémicas y reumatológicas*. Barcelona: Ed. Masson (2005) 775-792.

[284] Francis K. Chan, Lawrence C. Hung, Bing Y. Suen, Justin C. Wu, Kenneth C. Lee, Vincent K. Leung, Aric J. Hui, Ka F. To, Wai K. Leung, Vincent W. Wong, S.C. Chung, Joseph J. Sung, Celecoxib versus diclofenac and omeprazole in reducing the risk of recurrent ulcer bleeding in patients with arthritis, *N. Engl. J. Med.* 347 (2002) 2104-2110.

[285] D.L. Bhatt, J. Scheiman, N.S. Abraham, E.M. Antman, F.K.L. Chan, C.D. Furberg, D.A. Johnson, K.W. Mahaffey, E.M. Quigley, R.A. Harrington, E.R. Bates, C.R. Bridges, M.J. Eisenberg, V.A. Ferrari, M.A. Hlatky, S. Kaul, J.R. Lindner, D.J. Moliterno, D. Mukherjee, R.S. Schofield, R.S. Rosenson, J.H. Stein, H.H. Weitz, D.J. Wesley, ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use, *J. Am. Coll. Cardiol.* 52 (2008) 1502-1517.

[286] G. Fu, Y. He, C. Yu, Y. Gao, W. Gan, Preconcentration and determination of carbamate pesticide residues in vegetable samples by electrokinetic flow analysis with on-line hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction and spectrophotometry, *Spectrosc. Lett.* 42 (2009) 305-311.

[287] W. Kang, E. Kim, Simultaneous determination of aceclofenac and its three metabolites in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 587-591.

[288] E. Marco-Urrea, M. Pérez-Trujillo, C. Cruz-Morató, G. Caminal, T. Vicent, White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR, *Chemosphere* 78 (2010) 474-481.

[289] A. Aresta, T. Carbonara, F. Palmisano, C.G. Zambonin, Profiling urinary metabolites of naproxen by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1312-1316.

[290] S. Selke, M. Scheurell, M.R. Shah, H. Hühnerfuss, Identification and enantioselective gas chromatographic mass-spectrometric separation of O-desmethylnaproxen, the main metabolite of the drug naproxen, as a new environmental contaminant, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 419-423.

[291] S. Weigel, U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Hühnerfuss, Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites, *Chemosphere* 56 (2004) 583-592.

[292] M.R. Gómez, R.A. Olsina, L.D. Martínez, M.F.Silva, Simultaneous determination of cloramphenicol, salicylic acid and resorcinol by capillary zone electrophoresis and its application to pharmaceutical dosage forms, *Talanta* 61 (2003) 233-238.

[293] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar Capillary electrophoresis for the analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 133-153.

[294] Y. Li, Y. Liao, Y. Huang, Z. Ye, X. Huang, Dual functional monomers modified magnetic adsorbent for the enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water and urine samples, *Talanta* 201 (2019) 496-502.

[295] T. Martinez-Sena, S. Armenta, M. de laGuardia Francesc, A.Esteve-Turrillas, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water and urine using selective molecular imprinted polymer extraction and liquid chromatography, *J. Pharm. Biom. Anal.* 131 (2016) 48-53.

[296] Y.B. Cha, S. Myung, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine sample using HPLC/UV and three phase hollow fiber-liquid phase microextraction (HF-LPME), *Bull. Korean Chem. Soc.* 34 (2013) 3444-3450.

[297] Centro de información de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, España. <https://www.aemps.gob.es/>

[298] B.S. Siddiqui, H.N. Bhatti , A. Ijaz , S. Rasheed, B. Saleem , Urinary Excretion of Acetylsalicylic Acid in Healthy Male Volunteers, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6 (2003) 1413-1415.

[299] R. Runkel, M. Chaplin, G. Boost, E. Segre, E. Forchiell, Absorption, distribution, metabolism and excretion of naproxen in various laboratory animals and human subjects, *J. Pharm. Sci.* 61 (1972) 703-708.

[300] N.M. Davies, K.E. Anderson, Clinical pharmacokinetics of naproxen, *Clin. Pharmacokinet.* 32 (4) (1997) 268-293.

[301] R. Bushra, N. Aslam, An overview of clinical pharmacology of ibuprofen, *Oman Med. J.* 25 (3) (2010) 155-161.

[302] E.J. Antal, C.E. Wright, B.L. Brown, K.S. Albert, L.C. Aman, N.W. Levin, The influence of hemodialysis on the pharmacokinetics of ibuprofen and its major metabolites, *J. Clin. Pharmacol.* 26 (3) (1986) 184-190.

[303] V. Manzo, L. Honda, O. Navarro, L. Ascar, P. Richter, Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction, *Talanta* 128 (2014) 486-492.

CAPÍTULO 2. Estudio de los parámetros operacionales que afectan a la extracción mediante electromembrana de antiinflamatorios no esteroideos. Efecto de los contraiones en las fases donadora y aceptora

CHAPTER 2. SUMMARY

In this chapter a complete and comprehensive study of operational parameters affecting the electromembrane extraction of five widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in aqueous samples is described. Salicylic acid (SAC), ketoprofen (KTP) naproxen (NAX), diclofenac (DIC) and ibuprofen (IBU) were selected as model analytes.

EME conditions were optimized investigating the influence of the supported liquid membrane (SLM) nature, the pH of donor and acceptor solutions, the applied voltage and the extraction time of the target analytes. Likewise, the effect of donor and acceptor solutions composition was examined studying how the presence of different counter-ions (Li^+ , Na^+ , K^+ Cs^+), in both aqueous solutions, influences in the mass transfer of the compounds across the SLM.

The highest enrichment factors were achieved applying a voltage of 60 volts during 20 minutes to a donor solution at pH 7 (KOH adjusted) continuously stirred at a speed of 600 rpm. The analytes were extracted into 50 μL of an acceptor solution at pH 12 (NaOH 10 mM adjusted) using 1-octanol as SLM.

The obtained results, when the donor solution was alkalized with KOH and the acceptor solution with NaOH, were compared to previous reported methods for the determination of NSAIDs by EME using NaOH in donor and acceptor phases. The enrichment factors were within the range of 86 and 134 for all compounds, four times higher than the best enrichment factors earlier reported in bibliography.

The presence of K^+ and Na^+ as counter ions in the donor and the acceptor phases, respectively, demonstrated the nature of these ones contribute to improve the efficiency and the electrokinetic migration of the analytes through the SLM.

The proposed method was satisfactorily applied to the determination of the selected non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine samples.

The results of these study have been published in a high impact journal: (*Effect of counter-ions on electromembrane extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs, Journal of Electroanalytical Chemistry* 840 (2019) 255-262).

Desde la introducción de la extracción mediante electromembrana en 2006, se han investigado y analizado diferentes parámetros operacionales que influyen en el procedimiento de EME con el fin de que la migración electrocinética sea lo mayor posible. Los factores operacionales que han recibido mayor atención son la naturaleza o composición de la SLM, el pH de las disoluciones donadora y aceptora, la diferencia de potencial aplicado y el tiempo de extracción [1,2].

En la mayoría de los procedimientos de extracción electrocinética, sólo las especies químicas que se encuentren en forma iónica en la fase donadora pueden migrar a la fase aceptora cuando se aplica un campo eléctrico [3,4]. A. Gjelstad et al. [5], demostraron que la transferencia de masa a través de la SLM depende del balance iónico (χ) y que cuanto menor sea su valor, mayor será el flujo de analitos de una fase a otra y viceversa. Así pues, la composición de ambas disoluciones, especialmente su valor de pH, juega un papel crucial en los procesos de EME dado que los analitos deben encontrarse, preferentemente, en su forma iónica en cada una de las fases para garantizar la máxima eficacia de extracción [6,7].

En general, para la extracción de compuestos básicos el pH se ajusta con ácidos fuertes, como el ácido clorhídrico (HCl), mientras que para la extracción de compuestos ácidos el pH se ajusta con hidróxidos alcalinos como el hidróxido de sodio (NaOH). El uso de este tipo de ácidos y bases lleva asociada la presencia de importantes concentraciones de sus

respectivos contraiones tanto en la disolución donadora como en la disolución aceptora [8]. Sin embargo, la naturaleza de estos contraiones ha despertado una menor atención en el estudio de los procesos de electromembrana, a pesar de que se conoce que la presencia de los mismos, ya sea en una o en las dos fases, así como su tipología tiene una gran influencia en la difusión de los analitos cargados a través de la SLM [9].

Si bien, en algunos trabajos se ha descrito cómo contribuye la composición de la fases donadora y/o aceptora a la eficacia de la extracción en términos de pH, concentración y presencia de ciertos contraiones. Así, R.E.G. Jamt et al. [10], emplearon distintas composiciones de fase aceptora para analizar la presencia de seis fármacos de carácter básico en muestras de sangre. Para ello, seleccionaron cuatro ácidos diferentes (ácido acético, ácido fosfórico, ácido fórmico y ácido clorhídrico) y mantuvieron constante la concentración de los mismos (10 mM). Los resultados obtenidos indican que, para la mayoría de los compuestos seleccionados, la transferencia de masa dependía claramente del tipo de ácido utilizado para ajustar el pH de la fase aceptora.

H.H. See y P.C. Hauser [11], realizaron un estudio en el que incorporaron diferentes sales potásicas (CH_3COO^- , ClO_4^- , Cl^- , SO_4^{2-} , SCN^- y NO_3^-) en las fases donadora y aceptora para evaluar la influencia de los contraiones de naturaleza aniónica en el procedimiento de EME. Para ello utilizaron compuestos de tipo lipofílico como analitos modelo. Los resultados de este estudio revelaron que el rendimiento del proceso aumentaba en el orden $\text{SO}_4^{2-} < \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{NO}_3^- < \text{Cl}^- < \text{SCN}^- < \text{ClO}_4^-$, lo que indica que en presencia de iones sulfato la transferencia de masa era

menor que la que se producía en presencia iones perclorato. Así mismo, comprobaron que el rendimiento era el mismo independientemente de la concentración de sal empleada.

M. Balchen et al. [12], evaluaron cómo variaba la eficacia de la extracción según el tipo de ácido que se emplease en las disoluciones donadora y aceptora respectivamente. Para ello seleccionaron un total de nueve ácidos, entre los que se incluían tanto ácidos fuertes como ácidos débiles: ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido clorhídrico, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético y ácido tricloroacético. El análisis se realizó utilizando péptidos como analitos modelo y una concentración de ácido 1 mM en la fase donadora y 50 mM en la fase aceptora. Los rendimientos más bajos se obtuvieron con ácido acético, mientras que los ácidos clorhídrico, sulfúrico y fórmico proporcionaron los mejores resultados en términos de buenas recuperaciones y bajas corrientes eléctricas.

Por su parte, H. Chuixiu et al. [13], llevaron a cabo un estudio similar en el que, además del tipo de ácido, analizaron si la concentración del mismo influía en la eficacia del proceso. En una primera serie de experimentos, los ácidos trifluoroacético, clorhídrico, fosfórico, acético, fórmico y borónico se emplearon como fase aceptora manteniendo constante la concentración de los mismos (100 mM). Mientras que con los ácidos trifluoroacético, clorhídrico, fórmico y fosfórico la transferencia de masa era muy similar y considerablemente alta, con los ácidos borónico y acético la extracción resultó ser menos eficaz. Una vez seleccionado el ácido a emplear en la fase aceptora (ácido fosfórico), probaron diferentes

concentraciones del mismo (50, 100, 150, 200 y 250 mM), no observándose diferencias significativas en los rendimientos de extracción.

Análogamente, L. Striglerová et al. [14], no encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos al utilizar como fase aceptora ácido clorhídrico y ácido nítrico en un rango de concentraciones comprendido entre 10-50 mM para la extracción de litio en muestras biológicas de sangre, suero y orina.

S.N. Seyedeh et al. [15], plantearon un estudio impedométrico sobre el efecto que ejerce la presencia sales en los procesos de extracción mediante electromembrana tanto para compuestos ácidos como para compuestos básicos. Para ello, emplearon una amplia variedad de sales binarias y ternarias (NaCl, NaF, NaNO₃, KNO₃, KCl, LiCl, CH₃COONa, Na₂SO₄, Na₃PO₄, MgCl₂, LiClO₄, K₂CO₃). Los resultados concluyeron que, de forma general, la adición de sales influía negativamente en la migración de los analitos a través de la SLM, independientemente de la naturaleza ácida o básica de los mismos.

Por el contrario, en el estudio realizado por K.F. Seip et al. [16], en el que se evaluó el efecto de la presencia de NaCl en la extracción de diecisiete fármacos básicos, los resultados fueron diferentes. Para nueve de los fármacos, se observó que las recuperaciones obtenidas eran independientes del contenido de NaCl en la disolución, mientras que para los ocho compuestos restantes, la presencia de NaCl influía considerablemente en la migración de los mismos a través de la SLM. Finalmente, concluyeron que las sales pueden aumentar o disminuir la eficacia de la extracción dependiendo de la estructura química del compuesto, independientemente de si es ácido o básico.

También se ha investigado el efecto que ejercen en el transporte de materia tanto diferentes disoluciones tampón, como diferentes hidróxidos alcalinos cuando se utilizan para ajustar el pH de las fases donadora y aceptora.

Por un lado, M.S. Restan et al. [17], emplearon disoluciones reguladoras para la EME de cinco fármacos básicos mediante un sistema de extracción compuesto por una placa de 96 pocillos. Para ello, seleccionaron disoluciones tampón que cubrieran un intervalo de pH comprendido entre 2-6.8, entre las que se incluyen tampones fosfato, acetato y formiato. A partir de los resultados obtenidos, concluyeron que los mejores rendimientos de extracción se alcanzaban al utilizar, en la fase aceptora, tampones cuyo valor de pH fuese inferior a 4.8. Esto último se debía a que en ese rango de pHs, las recuperaciones obtenidas eran independientes tanto del tipo de tampón como de la concentración del mismo.

Por otro lado, P. Kubáň et al. [18], investigaron el efecto que ejercen los contraiones de diferentes hidróxidos alcalinos (LiOH, NaOH, KOH, RbOH, CsOH) cuando se emplean para fijar el pH de las disoluciones implicadas en el proceso de EME. Utilizando clorofenoles como analitos modelo, observaron que las recuperaciones variaban considerablemente en función de la combinación de hidróxidos elegida para ambas fases, obteniéndose los mejores resultados cuando se ajustaba el pH con KOH en la fase donadora y con CsOH en la fase aceptora. De este modo, llegaron a la conclusión de que la naturaleza del catión inorgánico que acompaña al grupo hidroxilo influía tanto en la selectividad como en la eficacia de la extracción.

Así pues, dada la influencia que puede llegar a tener la composición de las disoluciones donadora y aceptora en la eficacia de la extracción, en este capítulo se describe la optimización de un procedimiento de EME para el análisis de cinco fármacos ácidos pertenecientes a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): ácido salicílico (SAL), ketoprofeno (KTP), naproxeno (NAX), diclofenaco (DIC) e ibuprofeno (IBU). Dicho procedimiento comprende un estudio completo y exhaustivo de todos los parámetros operacionales que contribuyen a la migración electrocinética de los compuestos seleccionados, incluida la naturaleza de los cationes inorgánicos introducidos en las fases donadora y aceptora al utilizar diferentes hidróxidos alcalinos para fijar el pH de las mismas.

2.1. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA

La determinación de los AINEs seleccionados para este estudio, se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent-Technologies 1100 (Palo Alto, CA, EEUU) equipado con una bomba cuaternaria, un sistema de desgasificación a vacío, un compartimento termostatzado para la columna, un detector ultravioleta visible de fila de diodos (UV-DAD) y un detector de fluorescencia (FLD) programable. El sistema de inyección se compone de un inyector manual Rheodyne modelo 7725i equipado con un bucle para la muestra de 20 μ L de capacidad.

Las condiciones de separación y detección cromatográficas se adaptaron de un trabajo previo publicado en el Grupo de Investigación [19] en el que se describe el análisis de antiinflamatorios no esteroideos. La separación se llevó a cabo a una temperatura de 26°C en una columna

Hibar®100-4,6 Purosphere®STAR (VWR, Darmstadt, Alemania) de 100 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, con una fase estacionaria RP-18e y un tamaño de partícula de 3 µm, precedida de una precolumna Kromasil®(Sharlab S.L., Barcelona, España) de 15 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, con una fase estacionaria reversa de C-18 (PR-18e) y un tamaño de partícula de 5 µm.

Como fase móvil se empleó una mezcla de ácido fórmico al 0.1% (v/v) (pH 2.6) (componente A) y acetonitrilo (ACN) como modificador orgánico (componente B) a un flujo de 0.8 mL min⁻¹, utilizando una elución en gradiente. La separación se inicia con una composición de fase móvil con un 55% del componente A y un 45% del componente B, que se mantiene constante durante los primeros 5 minutos, seguida de una elución en gradiente, durante otros 5 minutos, en la que el porcentaje del componente B aumenta progresivamente desde el 45% inicial hasta alcanzar el 100%. Esta composición de fase móvil, se mantiene durante 2 minutos hasta completar la elución de todos los compuestos. La separación cromatográfica se completó en un total de 12 minutos. Una vez finalizada la separación, se esperan 4 minutos hasta la siguiente inyección para que la columna se estabilice y se alcancen nuevamente las condiciones iniciales.

La detección de SAL, NAX e IBU se realizó con un detector de fluorescencia (FLD) utilizando 230 nm como longitud de onda de excitación para los tres compuestos, siendo sus correspondientes longitudes de onda de emisión, 450 nm para el SAL y 280 nm para NAX e IBU. Por su parte, al no tratarse de compuestos fluorescentes, la detección de KTP y DIC se llevó a cabo con un detector ultravioleta-visible (UV-DAD) a longitudes de onda de 255 nm y 280 nm, respectivamente. Estos valores se seleccionaron

teniendo en cuenta la longitud de onda a la que aparece el máximo en sus correspondientes espectros de absorción, los cuales se registraron previamente mediante un espectrofotómetro de absorción ultravioleta-visible Thermo Spectronic Unicam UV 500 (Cambridge, Reino Unido).

La Figura 2.1, muestra el cromatograma tipo de una mezcla patrón de $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ de todos los compuestos analizados mediante el procedimiento cromatográfico anteriormente descrito.

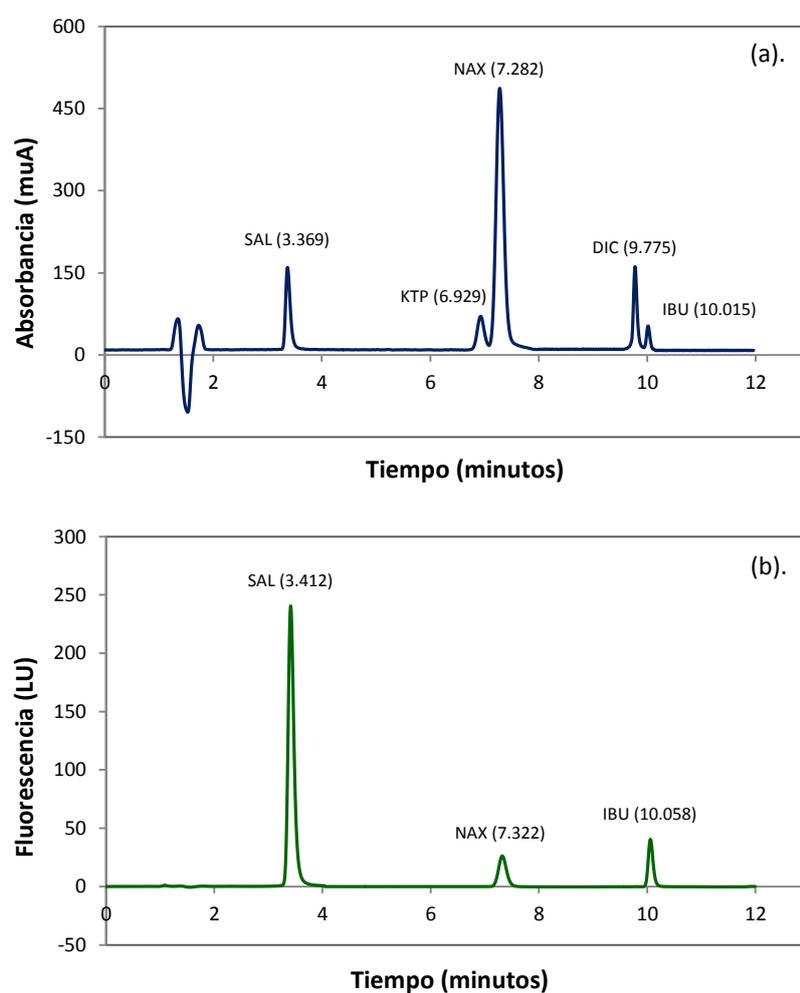


Figura 2.1. Cromatogramas correspondientes a la separación cromatográfica de los AINEs estudiados mediante HPLC: (a). Detección por DAD (λ : 250 nm), (b). Detección por FLD.

En la Tabla 2.1 se resumen brevemente las condiciones óptimas para la separación cromatográfica.

Tabla 2.1. Condiciones óptimas para la separación y detección cromatográfica de los AINES estudiados.

| Tiempo (min) | % Componente A | % Componente B | Flujo (mL/min) | | |
|--|----------------|----------------|----------------|------------|------------|
| 0 | 55 | 45 | 0.8 | | |
| 5 | 55 | 45 | 0.8 | | |
| 10 | 0 | 100 | 0.8 | | |
| 12 | 0 | 100 | 0.8 | | |
| | SAL | KTP | NAX | DIC | IBU |
| λ (nm) DAD | - | 255 | - | 280 | - |
| λ_{exc} (nm) FLD | 230 | - | 230 | - | 230 |
| λ_{em} (nm) FLD | 450 | - | 280 | - | 280 |

2.2. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL Y PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

El esquema del dispositivo experimental empleado para la optimización del procedimiento de extracción mediante electromembrana se representa en la Figura 2.2. Se trata del formato clásico, con el que se realizaron los primeros estudios de EME y con el que se comenzó a desarrollar la técnica. Además, se ha convertido en la configuración más popular ya que, hasta la fecha, la gran mayoría de los trabajos publicados se han llevado a cabo utilizando un dispositivo de este tipo [20].

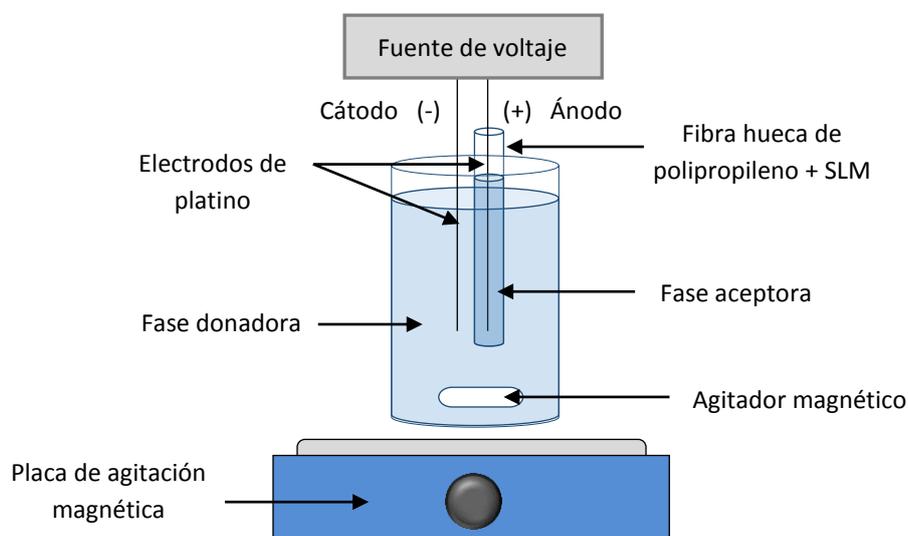


Figura 2.2. Dispositivo experimental empleado en el procedimiento de EME.

El sistema consta básicamente de cuatro partes: 1. un compartimento para la fase donadora, 2. dos hilos de platino, que actúan como polo positivo (+) (ánodo) y como polo negativo (-) (cátodo), 3. una fibra hueca de polipropileno y 4. una fuente de voltaje.

Como compartimento para la fase donadora se emplearon viales de vidrio, mientras que la fase aceptora se colocó en el interior de una fibra hueca porosa de polipropileno (Accurel® S6/2, diámetro interno 1800 μm , espesor de pared 450 μm y tamaño de poro 0.2 μm). Esta fibra posee una doble función, pues además de actuar como compartimento para alojar a la fase aceptora sirve como soporte para la membrana líquida soportada (SLM).

Las fibras se cortaron en pequeñas piezas de 3 cm de longitud, se lavaron con acetona en baño de ultrasonidos para eliminar restos de

partículas sólidas que pueden alojarse en los poros y se dejaron secar al aire. A continuación, se selló térmica y mecánicamente uno de los extremos de la fibra y, una vez sellada, se sumergió en el disolvente orgánico (1-octanol) durante 5 segundos para impregnar los poros completamente con el mismo. Posteriormente, el exceso de disolvente se eliminó con papel húmedo. Seguidamente, se introdujeron por el extremo abierto de la fibra 50 μ L de fase aceptora con la ayuda de una microjeringa, tras lo cual se colocó uno de los hilos de platino en el interior de la misma, sujetándola al sistema con ayuda de un fino hilo para evitar su caída y movimiento durante el proceso. Este conjunto se introdujo, a su vez, en un vial de vidrio que contiene la fase donadora (25 mL) y el otro hilo de platino. Ambos hilos de platino, con una longitud de 40 mm y un diámetro de 0.5 mm (Premion[®], 99.997% (metal basis) \approx 4.21 g/m, Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania), constituyen los electrodos del sistema y se disponen de forma paralela a una distancia promedio de 5 mm. Finalmente, los electrodos se conectaron a una fuente de voltaje (VWR International, West Chest, Pensilvania, EEUU) y se aplicó una diferencia de potencial adecuado para que tenga lugar el procedimiento de EME. Finalizado el tiempo de extracción, la fuente se desconectó, se recogió la fase aceptora con la ayuda de una microjeringa y se inyectó (20 μ L) en el sistema cromatográfico de líquidos para su posterior análisis.

Durante el procedimiento, la fase donadora se mantuvo en constante agitación a una velocidad de 600 rpm utilizando un agitador magnético (FB15107 Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EEUU) y se registró la intensidad de corriente generada (un dato cada 0.5 segundos) conectando en serie un multímetro digital (Peack Tech[®] modelo 3430, Ahrensburg, Alemania) que, a su vez, iba conectado a un ordenador.

2.2.1. Fibras huecas porosas de polipropileno

Las fibras huecas porosas de polipropileno son los soportes más comúnmente empleados para fijar el disolvente orgánico que actúa como SLM en las aplicaciones de extracción mediante electromembrana.

La elección de este material se debe fundamentalmente a su naturaleza hidrofóbica así como a su resistencia frente a diversos disolventes orgánicos y disoluciones tanto de carácter ácido como básico pues, a diferencia de otros materiales como el politetrafluoruro de etileno (PTFE), en las fibras de polipropileno no se observa degradación alguna tras ser impregnada con los disolventes orgánicos que se suelen utilizar en este tipo de técnicas [2,21].

Las fibras de polipropileno están disponibles comercialmente y tienen un coste muy reducido. Esto último permite desechar cada pieza una vez finalizada la extracción, evitando así fenómenos de contaminación cruzada entre muestras que se dan con mucha frecuencia en técnicas que emplean soportes reutilizables [22-24], asegurando así la reproducibilidad de la misma.

En el mercado, existe una amplia variedad de fibras huecas de polipropileno que se diferencian entre sí según su diámetro interno, el espesor de la pared y el tamaño de poro. La modalidad empleada en este estudio es la Accurel®S6/2, con un diámetro interno de 1800 μm , un espesor de pared de 450 μm y un tamaño de poro de 0.2 μm . Este tamaño de poro, que permite el paso de compuestos de tamaño reducido, a la vez que evita la extracción de cualquier tipo de macromolécula que pueda

estar presente en la muestra a analizar (proteínas, lípidos). Como resultado, se obtiene una gran selectividad así como extractos muy limpios (*clean-up*) incluso cuando se trata de muestras con matrices complejas (biológicas, medioambientales, alimentarias) [25]. Además, la geometría cilíndrica de la fibra proporciona una elevada superficie específica respecto de su volumen interno, lo que permite obtener una buena eficacia de extracción empleando volúmenes reducidos de fase aceptora [26].

Por otra parte, la estructura porosa de la pared, con cavidades de diferentes formas y volúmenes conectadas a través de trayectorias de distinto diámetro, contribuye a que la membrana líquida se inmovilice de forma rápida y homogénea en la superficie de la fibra [27] La Figura 2.3 muestra una imagen de la estructura del soporte obtenida por Microscopía Electrónica de Barrido (*Scanning Electron Microscopy, SEM*). Se trata de una técnica de microscopía en la que se hace incidir un haz de electrones sobre un área de muestra del tamaño deseado, formando así una imagen de alta resolución que permita la visualización de la superficie de la misma mediante interacciones electrón-materia. Es decir, emplea un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen de la muestra.

El instrumento que permite llevar a cabo la medición es un microscopio electrónico de barrido, en el que los electrones se aceleran en un campo eléctrico mediante una diferencia de potencial que puede ir desde los 50 hasta los 30000 voltios. Los electrones acelerados se enfocan sobre la muestra de forma que sobre ella incida un haz lo más pequeño posible para así obtener una mejor resolución. Salvo que sea conductora, la muestra se recubre previamente con una capa muy fina de oro o de carbón de forma que adquiera carácter conductor. Cuando el haz de electrones

alcanza la superficie de la muestra, interacciona con los átomos de la misma, obteniéndose como resultado electrones retro-dispersados, electrones secundarios y radiación electromagnética (rayos X). Esta energía es recogida por los detectores del microscopio, que la transforman en imágenes de alta resolución (detector de electrones secundarios), imágenes de menor resolución pero mayor contraste para obtener la topografía de la superficie (detector de electrones retro-dispersados) o bien, realizan un análisis espectrográfico de la composición de la muestra (detector de energía dispersiva). De todos ellos, el más empleado es el detector de electrones secundarios, que ofrece una imagen en blanco y negro de la superficie de la muestra analizada.

Así pues, la estructura de la fibra se caracterizó mediante un microscopio de electrónico de barrido modelo Hitachi S5200 equipado con un detector de electrones secundarios del Servicio de Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) con una resolución máxima entre puntos de 5Å.

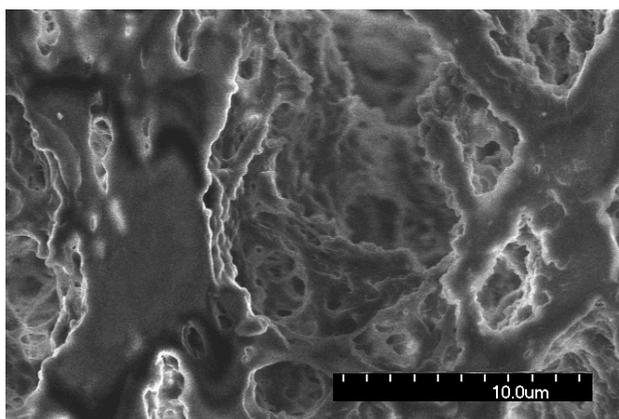


Figura 2.3. Imagen de la estructura porosa de las fibras huecas de polipropileno obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado, se describirá la optimización de cada una de las variables operacionales que influyen en la extracción mediante electromembrana de los antiinflamatorios no esteroideos seleccionados. Así mismo, se discutirán y analizarán los resultados obtenidos a fin de seleccionar, en cada caso, los que proporcionen los mayores rendimientos de extracción posibles.

Una vez propuesto el correspondiente procedimiento de EME, se llevará a cabo la validación analítica del mismo para, finalmente, evaluar si es adecuado para la determinación de los compuestos objeto de estudio en muestras reales de orina humana.

2.3.1. Optimización de los parámetros operacionales del procedimiento de extracción

La optimización de los parámetros operacionales se llevó a cabo analizando la influencia sobre la eficacia de extracción de las siguientes variables: el disolvente orgánico empleado como membrana líquida soportada, el pH, la composición y el volumen de las fases donadoras y aceptora, el voltaje aplicado y el tiempo de extracción.

Tomando como referencia estudios previos realizados en el Grupo de Investigación en el que desarrolla esta Tesis Doctoral, se hicieron una serie de ensayos preliminares a partir de cuyos resultados se fijaron las condiciones experimentales de partida. De este modo, se estableció un volumen inicial de 10 mL para la fase donadora y de 50 μ L para la fase

aceptora, el pH de ambas fases se ajustó a un valor de 12 con NaOH 10 mM y, a continuación, se aplicó una diferencia de potencial de 30 voltios durante 20 minutos utilizando 1-octanol como SLM. Finalmente, y a fin de facilitar e incrementar la transferencia de masa, la fase donadora se agitó a una velocidad constante de 600 rpm durante los 20 minutos de extracción. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando como fase donadora disoluciones acuosas de concentración $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de todos los AINEs seleccionados.

2.3.1.1. Elección del disolvente orgánico a emplear como SLM

Aunque los alcoholes lineales de cadena larga suelen ser los disolventes orgánicos más apropiados para la extracción de compuestos de naturaleza ácida [28,29], se probaron diferentes tipos de disolventes orgánicos como potenciales membranas líquidas soportadas. Se seleccionaron un total de 14 disolventes tratando de abarcar una amplia variedad de grupos funcionales: benceno, 1-butanol, cloroformo, ciclohexano, diclorometano, dihexil éter, n-hexano, 1-heptanol, 2-metil-1-propanol (isobutanol), 2-nitrofenil octil éter (NPOE), 1-octanol, 1-pentanol, tolueno y xileno.

En función de los resultados obtenidos, los disolventes se clasificaron en tres grupos. El primer grupo abarcaba todos aquellos disolventes que resultaron ser ineficaces como SLM en los procedimientos de EME debido a que presentaban una conductividad eléctrica muy baja o nula, lo cual imposibilitaba la extracción de los compuestos al interrumpirse el paso de corriente. Dentro de este grupo se encontraban: benceno, ciclohexano, dihexil éter, 2-nitrofenil octil éter, tolueno y xileno, a pesar de que algunos

de ellos como el dihexil éter [30-34], el tolueno [35-38], el hexano [39] o el ciclohexano [40] se han utilizado previamente con éxito en procedimientos de microextracción en fase líquida (HF-LPME).

En el segundo grupo se incluyeron aquellos disolventes que no eran adecuados para ser utilizados como membrana líquida: 1-butanol, cloroformo, diclorometano, isobutanol y 1-pentanol. Aunque estos disolventes no provocaban la interrupción de la corriente eléctrica, generaban intensidades de corrientes muy elevadas dando como resultado extracciones inestables, con factores de enriquecimiento variables y poco reproducibles. En algunos casos, además, se producía la pérdida de parte del volumen de fase aceptora debido a la presencia de una fuerte electrolisis causada por estas altas intensidades de corrientes.

El tercer grupo estaba formado por aquellos disolventes que podían ser utilizados como SLM en los procedimientos de EME. Con estos disolventes, el sistema permanecía estable, obteniéndose, además, mejores resultados, en términos de reproducibilidad, que con los disolventes del grupo anterior, con intensidades de corriente más bajas y mejores factores de enriquecimiento. Este grupo lo integraban 1-heptanol y 1-octanol.

Como puede verse en la Tabla 2.2, cuando se empleaba 1-octanol como SLM se obtuvieron factores de enriquecimiento más elevados así como una menor desviación estándar relativa de los resultados (%RSD). Así mismo, la corriente eléctrica promedio registrada fue dos veces más baja (41 μA frente a los 84 μA registrados con 1-heptanol), lo que se traduce en una mayor estabilidad y reproducibilidad del sistema y, por lo tanto, de los

resultados. Por todo ello, se seleccionó 1-octanol como membrana líquida soportada para el resto de los ensayos.

Tabla 2.2. Factores de enriquecimiento obtenidos cuando se emplean 1-heptanol y 1-octanol como SLM en las condiciones operacionales inicialmente seleccionadas.

| Factores de Enriquecimiento ^a | | | | | |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| SLM | AINEs | | | | |
| | SAL ^b | KTP ^c | NAX ^b | DIC ^c | IBU ^b |
| Heptanol | 11.4 ± 1.2 | 20.4 ± 2.7 | 10.7 ± 1.1 | 16.3 ± 2.4 | 21.5 ± 3.2 |
| Octanol | 25.1 ± 1.4 | 36.8 ± 0.6 | 31.7 ± 2.6 | 35.2 ± 2.3 | 65.9 ± 2.1 |

^aMedia correspondiente a tres extracciones ± desviación estándar. %RSD para 1-heptanol: 10-15%. %RSD para 1-octanol: 2-8%.

^bDetección por FLD

^cDetección por DAD

2.3.1.2. Influencia del pH de las fases donadora y aceptora

Como ya se ha mencionado anteriormente, a fin de asegurar una movilidad electrocinética suficiente desde la fase donadora hasta la fase aceptora, el pH de las mismas debe ajustarse de forma que los analitos, ya sean de naturaleza ácida o básica, se encuentren completamente ionizados en ambas [41,42].

El pH de la fase donadora se estudió entre 3 y 13, manteniendo fijo el pH de la fase aceptora a un valor de 12 con NaOH 10 mM. Los valores de pH 3 y 4 se fijaron utilizando HCl, pH 5.2 era el pH, sin ajustar, de la disolución acuosa de los analitos y para ajustar los valores correspondientes el intervalo de pH 6-13 se utilizó NaOH.

En la Figura 2.4 se muestran los resultados obtenidos en cada caso. Como puede verse, para todos los compuestos, los mayores factores de enriquecimiento se obtenían a pH 7 y disminuían gradualmente tanto por encima como por debajo de dicho valor. Teniendo en cuenta que los AINES seleccionados tienen valores de pKa inferiores a 5, a pH 7 se encuentran ionizados prácticamente en su totalidad, hecho que favorece la migración electrocinética de los analitos hacia la fase aceptora en este tipo de procedimientos. Por lo tanto, se seleccionó pH 7 como valor óptimo para el pH de la fase donadora.

Por otra parte, resulta especialmente notable como a pHs extremadamente básicos los factores de enriquecimiento decaen bruscamente. Este comportamiento se debe, principalmente, a que a valores de pH superiores a 12, estos compuestos tienden a degradarse, dando como resultado extracciones más pobres.

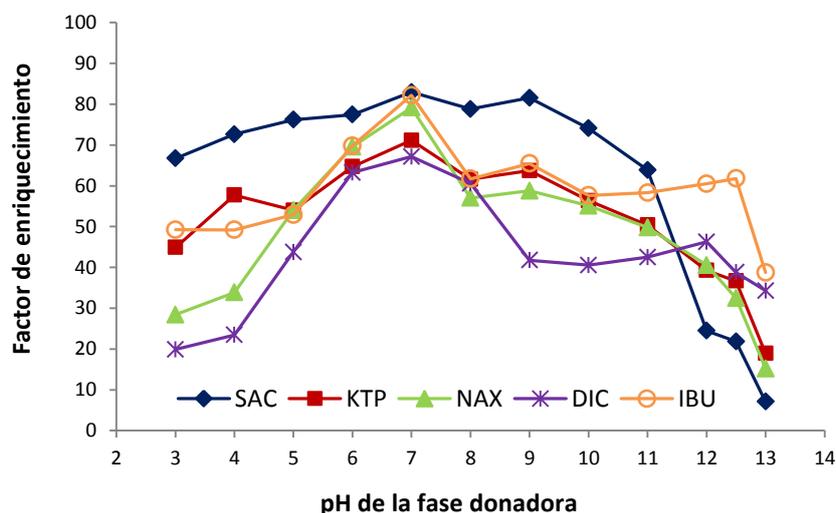


Figura 2.4. Influencia del pH de la fase donadora. %RSD < 11%.

Del mismo modo, se llevó a cabo la optimización del pH de la fase aceptora. Se estudió un intervalo de valores comprendido entre 9 y 13, manteniendo para ello el pH de la fase donadora fijo a pH 7. En este caso, todos los valores de pH que se probaron para la fase aceptora se fijaron utilizando NaOH.

Como se observa en la Figura 2.5, la eficacia de la extracción depende considerablemente del pH de la fase aceptora, obteniéndose los mayores factores de enriquecimiento cuando la extracción se realizaba a pH 12. Sin embargo, a valores de pH más bajos los compuestos prácticamente no se extraían mientras que a valores de pH más altos la eficacia de la extracción disminuía drásticamente. J.M. Kim et al. [43] explicaron este comportamiento teniendo en cuenta que la migración de los compuestos de naturaleza ácida a través de la interfase entre la membrana líquida y la fase aceptora, se ve favorecida por la protonación parcial de los mismos en el medio no acuoso. De este modo, a valores de pH inferiores a 10 la concentración de protones en la interfase SLM-fase aceptora es tan alta que cuando los compuestos, inicialmente ionizados, migran hacia fase aceptora interaccionan con los protones presentes en dicha interfase, dando como resultado una forma neutra que es soluble en la SLM. Como consecuencia, los compuestos neutros regresan a la fase donadora a través de un mecanismo de difusión pasiva. Por el contrario, a valores de pH iguales o superiores a 10 la concentración de protones en la interfase SLM-fase aceptora es mucho menor, de forma que los compuestos, al encontrarse parcialmente desprotonados en la SLM, migrarán fácilmente hacia la fase aceptora. Así pues, se estableció pH 12 como valor óptimo para el pH de la fase aceptora.

La disminución en los factores de enriquecimiento que se observaba a valores de pH superiores a 12, se debía, fundamentalmente, a que los compuestos se degradaban. Dicha degradación era especialmente significativa para SAL y NAX, compuestos para los que no se obtuvo ningún tipo de resultado a pH 13.

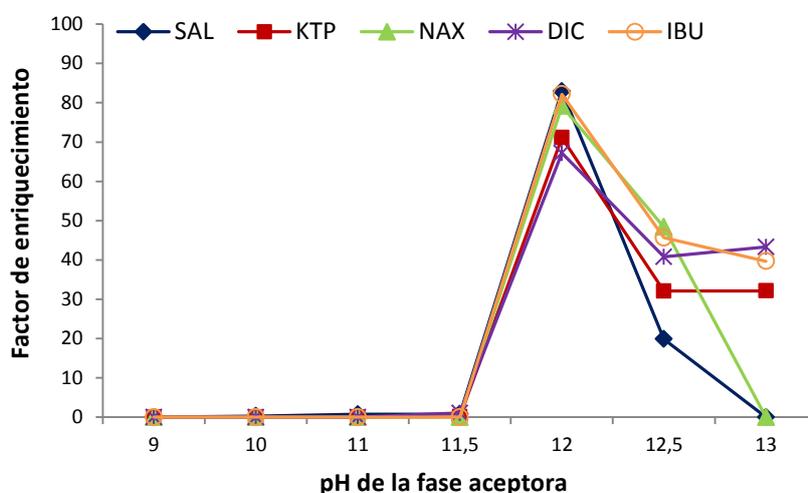


Figura 2.5. Influencia del pH de la fase aceptora. %RSD < 8%.

Todas las extracciones se realizaron aplicando un voltaje de 30 voltios durante 20 minutos.

2.3.1.3. Influencia del volumen de las fases donadora y aceptora

En primer lugar se estudió cómo influía el volumen de la fase donadora en la eficacia de la extracción manteniendo fijo el volumen de la fase aceptora en 50 μ L. Los volúmenes de fase donadora analizados fueron 5, 10, 15, 20, 25, 50 y 100 mL. Según la tendencia observada en la Figura 2.6, la dependencia de la eficacia de la extracción respecto del volumen de

la fase donadora no parece significativa. De entre todos los volúmenes ensayados, los mejores factores de enriquecimiento se obtuvieron para un volumen de fase donadora de 25 mL, con valores comprendidos entre 65 para DIC y 88 para SAL.

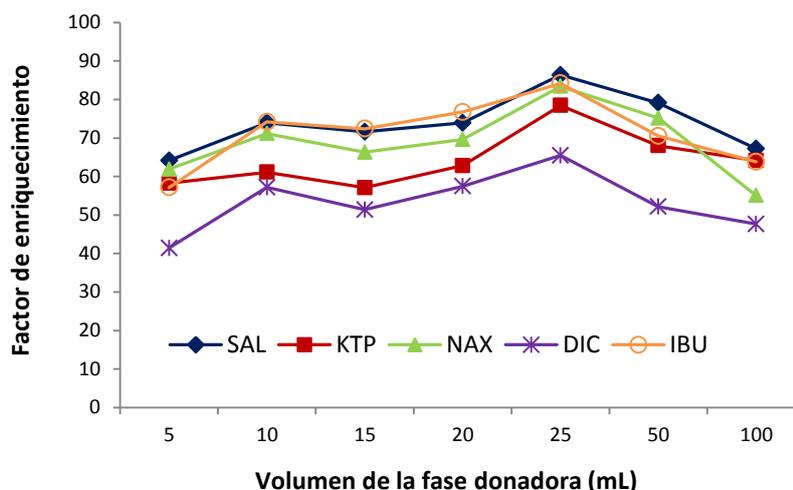


Figura 2.6. Influencia del volumen de la fase donadora. %RSD < 7%.

Una vez fijado el volumen de fase donadora, se evaluó la influencia del volumen de la fase aceptora. Debido al propio diseño del dispositivo experimental, volúmenes superiores a 50 μL no pudieron ser analizados, de modo que el estudio se realizó reduciendo el volumen de fase aceptora. En concreto, el volumen de ésta se redujo a la mitad. Al hacer esto, la relación de volúmenes entre ambas fases se duplica, por lo que en teoría los factores de enriquecimiento deben aumentar ya que los compuestos se extraen a un menor volumen de fase aceptora. Sin embargo, al contrario de lo que cabía esperar, los factores de enriquecimiento disminuyeron entre un 16 y un 41% para todos los compuestos estudiados (41% para SAL,

40% para KTP, 27% para NAX, 16% para DIC y 34% para IBU) respecto de los obtenidos con 50 μ L de fase aceptora. Este comportamiento podría deberse al hecho de que al reducir el volumen de fase aceptora a la mitad, el electrodo inmerso en la fibra quedaba sólo parcialmente sumergido en los 25 μ L de disolución, por lo que el campo eléctrico generado al aplicar la diferencia de potencial no ejercía el mismo efecto sobre el transporte de materia que cuando el electrodo se encontraba completamente cubierto por la fase aceptora, dando como resultado una disminución en la eficacia de la extracción.

Por lo tanto los volúmenes de fase donadora y fase aceptora se fijaron en 25 mL y 50 μ L, respectivamente, para el resto de los estudios.

2.3.1.4 Influencia del voltaje aplicado y del tiempo de extracción

En los procedimientos de EME, el campo eléctrico que se genera al aplicar una diferencia de potencial entre los dos electrodos es el principal responsable de la migración de los analitos desde la fase donadora hasta la fase aceptora a través de la membrana líquida soportada. Así pues, cabe esperar que el rendimiento del proceso aumente al aumentar tanto el voltaje aplicado como el tiempo de extracción [44,45]. No obstante, debido a los problemas de inestabilidad que llevan asociados los voltajes y tiempos de extracción prolongados, cuando ambos parámetros se consideran simultáneamente, se produce un efecto antagónico dado que un aumento en el voltaje limita el tiempo de extracción y viceversa. Por esta razón, ambas variables deben optimizarse de forma que se obtenga la mayor eficacia de extracción posible sin sacrificar la estabilidad del sistema [46-48].

Teniendo en cuenta lo anteriormente indicado, la influencia del voltaje se estudió en un rango comprendido entre 10 y 100 voltios. De acuerdo con la Figura 2.7, los factores de enriquecimiento de los compuestos aumentaban progresivamente desde los 10 hasta los 60 voltios. Por su parte, al aplicar una diferencia de potencial de 80 voltios se observaba un ligero descenso en la eficacia del proceso mientras que a 100 voltios los resultados fueron, aproximadamente, un 60% más bajos que los que se alcanzaban a 60 voltios. Así mismo, se registró la intensidad de corriente generada durante la extracción para cada uno de los voltajes estudiados, obteniéndose valores de corriente promedio que iban desde los 12 a los 98 μA . De este modo, la disminución que se observó en los factores de enriquecimiento obtenidos a voltajes mayores de 60 voltios pudo deberse a que a esos voltajes se alcanzaron intensidades de corriente demasiado altas. Estas corrientes elevadas llevan implícita la multiplicación de las reacciones de electrolisis, fenómeno que afecta negativamente a la eficacia de la extracción.

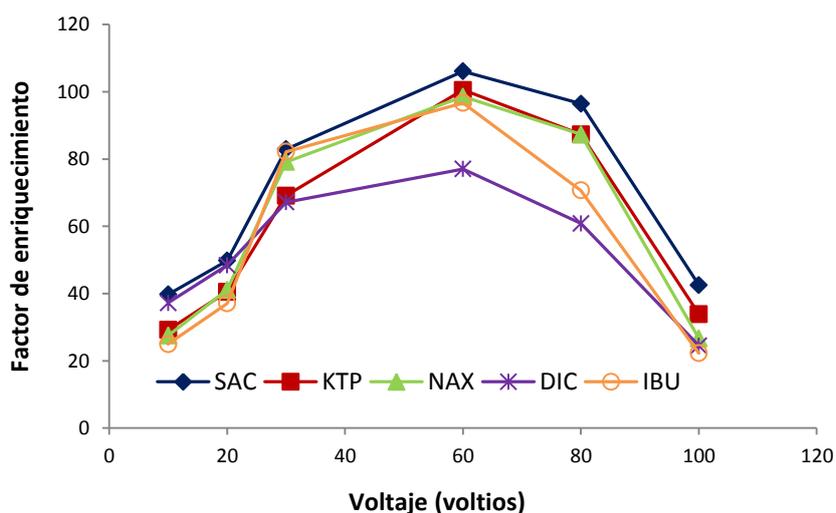


Figura 2.7. Influencia del voltaje aplicado. %RSD < 10 %.

Por lo tanto, se seleccionó un voltaje de 60 voltios como voltaje óptimo para la extracción de los compuestos objeto de estudio, obteniéndose factores de enriquecimiento comprendidos entre 77 para DIC y 106 para SAL.

Por su parte, el tiempo de extracción se optimizó para valores comprendidos entre 5 y 25 minutos (5, 10, 15, 20 y 25 minutos). Según la tendencia observada en la Figura 2.8, los factores de enriquecimiento aumentaban progresivamente para todos los AINEs a medida que se iba incrementando la duración de la extracción. Esta tendencia creciente se mantenía hasta los 20 minutos, momento en el cual se alcanzaba el rendimiento máximo del proceso, ya que a tiempos superiores a éste los factores de enriquecimientos disminuían significativamente para todos los compuestos. Esto último puede deberse a una resistencia a la transferencia de masa como resultado del aumento del espesor de la doble capa eléctrica alrededor de la SLM a tiempos de extracción prolongados. Dicho aumento se produce como consecuencia de la acumulación de iones a ambos lados de las correspondientes interfases de la SLM con las fases donadora y aceptora [49].

Así pues, 20 minutos fue el tiempo seleccionado como óptimo para el procedimiento de extracción electrocinética descrito. De este modo, con las condiciones operacionales optimizadas hasta el momento, los factores de enriquecimiento obtenidos para cada compuesto fueron: 106 para SAL, 100 para KTP, 93 para NAX, 77 para DIC y 97 para IBU.

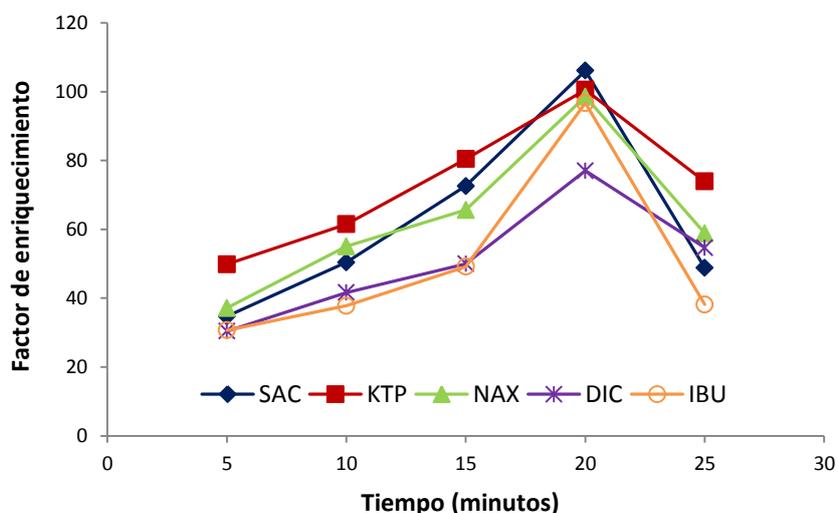


Figura 2.8. Influencia del tiempo de extracción. %RSD <9%.

En dichas condiciones óptimas de operación, se registró la intensidad de corriente generada durante el tiempo de extracción. De acuerdo con la Figura 2.9, la intensidad de corriente, tras aumentar bruscamente al inicio decae ligeramente para, a continuación, aumentar progresivamente hasta alcanzar un valor máximo. Una vez superado el máximo de intensidad, la corriente disminuye paulatinamente hasta llegar a los 12 minutos de extracción, momento en el que adquiere un valor que se mantiene aproximadamente constante hasta completar los 20 minutos que dura la extracción. Por su parte, el pico de intensidad que se forma al comienzo del proceso corresponde a la formación de la doble capa eléctrica a ambos lados de la membrana líquida como consecuencia de la diferencia de potencial aplicado. La formación de este pico es crucial para que se dé la migración electrocinética y, una vez que se forma, la corriente registrada depende principalmente del flujo de iones a través de la SLM, por lo que a partir de ese momento es cuando se inicia la migración de los analitos hacia la fase aceptora [50].

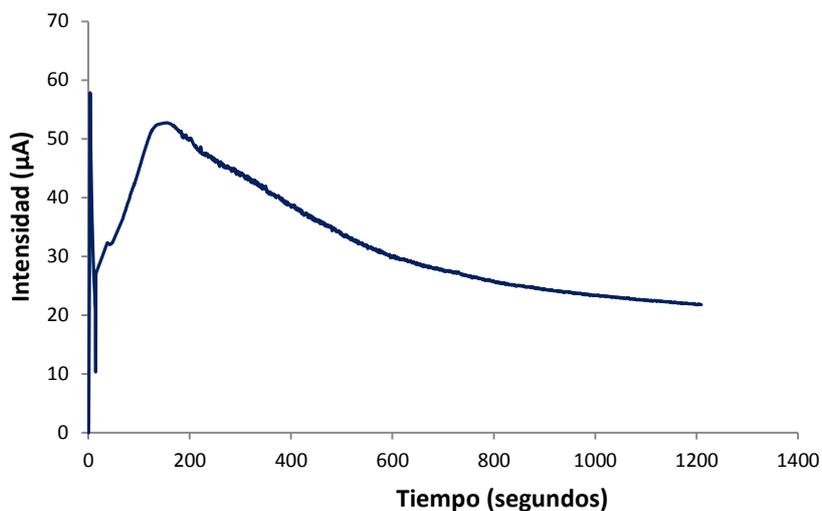


Figura 2.9. Tendencia de la intensidad de corriente registrada durante la EME en las condiciones óptimas de operación.

Por otra parte, del comportamiento del sistema en función de la intensidad de corriente promedio registrada, se dedujo, además, que para obtener los mejores resultados posibles, dicha intensidad debía estar comprendida entre 30 y 60 μA . De este modo, si la corriente promedio se situaba por debajo de 30 μA o por encima de 60 μA , se obtenían factores de enriquecimiento considerablemente inferiores a los que resultaban cuando se encontraba dentro del rango de valores anteriormente indicado. Así mismo, se observó que cuando la intensidad promedio oscilaba entre 30 y 60 μA , existía una relación inversa entre ésta y la eficacia de la extracción. Es decir, cuanto más próximo fuese el valor promedio de intensidad al límite inferior, mejores eran los factores de enriquecimiento obtenidos, y viceversa.

2.3.1.5. Influencia de la composición de las fases donadora y aceptora

Como ya se comentó al comienzo del capítulo, la composición de las dos fases implicadas en el procedimiento de EME es otro parámetro a tener en cuenta, ya que la presencia de determinadas especies iónicas puede contribuir a mejorar el rendimiento del proceso. De este modo, una vez optimizadas las principales variables operacionales, se estudió cómo influye la composición de las fases donadora y aceptora en la eficacia de la extracción. Para ello, se emplearon diferentes combinaciones de hidróxidos alcalinos para ajustar el pH de ambas disoluciones y se analizó el comportamiento de los factores de enriquecimiento en presencia de los contraiones metálicos correspondientes a cada uno de los hidróxidos seleccionados.

El hidróxido de sodio (NaOH), es el álcali más comúnmente empleado para ajustar el pH de las disoluciones implicadas en los procesos de extracción electrocinética cuando se analizan compuestos de carácter ácido [8]. Teniendo en cuenta que el responsable de la alcalinización es el anión hidroxilo (OH^-), parece que su contraion, el catión sodio (Na^+), es, a priori, un simple espectador del proceso. Llegados a este punto y teniendo en cuenta que la transferencia de masa a través de la SLM depende en gran medida del balance iónico (χ), surge la pregunta de si la presencia de ese contraion en la disolución es simplemente circunstancial o si por el contrario influye de alguna manera en el rendimiento de la extracción. De este modo, manteniendo el mismo tipo de anión en ambas disoluciones (el ion hidroxilo, OH^- , en este caso), se evaluó si al emplear otros hidróxidos alcalinos para fijar el pH de las fases donadora y aceptora se producían

cambios en los valores de los factores de enriquecimiento obtenidos para cada analito.

Los hidróxidos seleccionados fueron hidróxido de litio (LiOH), hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), e hidróxido de cesio (CsOH). Se realizaron un total de 16 combinaciones utilizando cada uno de ellos tanto en la fase donadora como en la fase aceptora. Para el resto de parámetros operacionales se mantuvieron los valores previamente optimizados. De este modo, las distintas extracciones se llevaron a cabo aplicando un voltaje de 60 voltios durante 20 minutos a una fase donadora constituida por una disolución acuosa que contenía todos los AINES seleccionados a una concentración de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y cuyo pH se ajustó a 7 utilizando un hidróxido alcalino diferente cada vez. Como fase aceptora se emplearon disoluciones de concentración 10 mM (pH 12) del hidróxido alcalino que corresponda preparadas por dilución a partir de disoluciones de concentración 2 M.

Los factores de enriquecimiento obtenidos así como la intensidad de corriente promedio registrada durante la EME con cada una de las combinaciones de hidróxidos utilizadas se resumen en la siguiente tabla (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Resultados de la combinación de LiOH, NaOH, KOH y CsOH para ajustar el pH de las fases donadora (pH 7) y aceptora (pH 12).

| Fase donadora | Fase aceptora | Factores de enriquecimiento ^a | | | | | Intensidad de corriente (μA) |
|---------------|---------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------------|
| | | SAL ^b | KTP ^c | NAX ^b | DIC ^c | IBU ^b | |
| LiOH | LiOH | 112.2 ± 4.9 | 106.0 ± 8.8 | 80.2 ± 2.8 | 53.2 ± 5.1 | 90.4 ± 1.5 | 43.5 ± 1.8 |
| | NaOH | 110.4 ± 6.8 | 97.7 ± 4.2 | 75.1 ± 6.3 | 57.8 ± 3.8 | 89.7 ± 6.7 | 39.7 ± 0.8 |
| | KOH | 106.3 ± 0.5 | 102.9 ± 6.2 | 78.8 ± 2.7 | 84.6 ± 4.8 | 98.2 ± 4.9 | 31.9 ± 1.5 |
| | CsOH | 79.9 ± 6.7 | 100.9 ± 4.1 | 68.8 ± 0.7 | 54.3 ± 5.4 | 88.3 ± 2.3 | 37.8 ± 3.6 |
| NaOH | LiOH | 104.1 ± 9.2 | 99.6 ± 3.2 | 75.1 ± 6.6 | 52.2 ± 6.6 | 90.1 ± 5.3 | 45.5 ± 2.9 |
| | NaOH | 106.1 ± 4.3 | 100.5 ± 4.8 | 92.5 ± 5.6 | 77.1 ± 3.8 | 96.7 ± 2.1 | 36.7 ± 3.5 |
| | KOH | 113.4 ± 11.5 | 110.2 ± 0.9 | 73.7 ± 0.4 | 89.2 ± 0.5 | 103.4 ± 1.7 | 35.9 ± 3.6 |
| | CsOH | 63.8 ± 6.8 | 64.2 ± 5.4 | 39.5 ± 2.3 | 25.3 ± 0.6 | 38.1 ± 4.6 | 47.1 ± 3.7 |
| KOH | LiOH | 110.5 ± 5.3 | 103.7 ± 3.6 | 71.2 ± 1.7 | 52.6 ± 0.9 | 93.1 ± 7.6 | 27.9 ± 2.3 |
| | NaOH | 134.3 ± 6.7 | 121.9 ± 4.1 | 106.1 ± 7.9 | 85.6 ± 3.7 | 115.9 ± 6.7 | 30.0 ± 4.5 |
| | KOH | 118.5 ± 9.3 | 106.8 ± 4.6 | 73.6 ± 3.7 | 89.4 ± 7.2 | 101.3 ± 6.0 | 27.9 ± 3.5 |
| | CsOH | 112.8 ± 5.9 | 104.9 ± 5.4 | 73.5 ± 3.7 | 59.0 ± 5.9 | 104.9 ± 7.1 | 33.4 ± 3.1 |
| CsOH | LiOH | 88.3 ± 2.0 | 92.7 ± 2.3 | 70.5 ± 2.7 | 55.0 ± 5.1 | 99.5 ± 1.8 | 37.2 ± 0.9 |
| | NaOH | 101.6 ± 6.0 | 102.5 ± 2.3 | 84.4 ± 1.12 | 58.6 ± 4.9 | 95.1 ± 1.1 | 36.7 ± 1.8 |
| | KOH | 100.4 ± 8.0 | 107.5 ± 5.0 | 75.7 ± 2.9 | 72.0 ± 6.1 | 102.6 ± 5.2 | 34.9 ± 2.2 |
| | CsOH | 91.3 ± 3.4 | 91.3 ± 5.9 | 67.5 ± 4.5 | 49.6 ± 5.3 | 85.6 ± 6.1 | 41.7 ± 1.3 |

^aMedia correspondiente a tres determinaciones ± desviación estándar (%RSD < 11%).

^bDetección por FLD.

^cDetección por DAD.

La intensidad de corriente promedio del sistema durante el tiempo de extracción se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$I = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^m I_i(t)$$

dónde:

$I(t)$ es la corriente que pasa a través del sistema en el instante de tiempo (t)

n es el número total de datos registrados en el tiempo que dura la extracción

Teóricamente, al aplicar el voltaje de extracción, los contra-cationes presentes en la fase aceptora migran hacia el electrodo negativo en función de sus movilidades electroforéticas y cruzan la SLM de acuerdo con la selectividad de éstos en ella. Por lo tanto, las transferencias totales de cationes inorgánicos hacia la disolución donadora, las corrientes eléctricas promedio y las cargas eléctricas totales variarán para disoluciones aceptoras alcalinizadas con diferentes hidróxidos. Como consecuencia, la transferencia de los analitos con carga negativa en la dirección opuesta a la transferencia de cationes inorgánicos también se verá influenciada por la naturaleza de los contra-cationes en las soluciones aceptoras a fin de intentar mantener la electroneutralidad del sistema de extracción [18]. De este modo, la transferencia de los AINEs desde la fase donadora hacia la fase aceptora debería ser mayor con aquellos contra-cationes que presentan mayores movilidades electroforéticas. Así pues, deberían seguir

el orden $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Cs}^+$. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la combinación con la que se obtienen los mejores factores de enriquecimiento para la mayoría de los analitos es la que incluye KOH en la fase donadora y NaOH en la fase aceptora. Además, al contrario de lo descrito por P. Kubáň et al., que obtuvieron los mejores resultados con la combinación KOH/CsOH en la fase donadora y aceptora respectivamente, los factores de enriquecimiento, en general, empeoran cuando el catión Cs^+ está presente en alguna de las dos disoluciones implicadas en el proceso o en las dos. Este hecho parece estar relacionado, en nuestro caso, con un fenómeno de electrodeposición sobre los electrodos que afecta negativamente al proceso de extracción.

Por otra parte, el valor promedio de la intensidad de corriente es inferior a $50 \mu\text{A}$ en todos los casos, lo cual es indicativo de que el uso de distintos tipos de hidróxidos no afecta a la estabilidad del sistema observándose, además, una relación inversa ente la intensidad de corriente registrada y los factores de enriquecimiento obtenidos, como cabía esperar.

Si se analiza ahora cada compuesto de manera individual (Figura 2.10), la tendencia general que se observa es que, para la mayoría de las combinaciones, la diferencia entre los factores de enriquecimiento no es muy significativa excepto cuando se utiliza el par NaOH/CsOH en las fases donadora y aceptora, respectivamente. En este caso, los factores de enriquecimiento para todos los compuestos, con valores inferiores a 65, fueron mucho menores que los obtenidos con el resto de combinaciones. Así mismo, los factores de enriquecimiento para el ácido salicílico, el ketoprofeno y el ibuprofeno son los que menos se ven afectados por la

presencia de diferentes contraiones en el medio, mientras que para el naproxeno, los mejores resultados se obtuvieron claramente con el par KOH (fase donadora)/NaOH (fase aceptora). Para el diclofenaco, en cambio, el efecto de la presencia de diferentes contraiones en cada una de las disoluciones fue más acusado, observándose una mayor variabilidad en los factores de enriquecimiento, especialmente cuando el KOH estaba presente en las dos fases o únicamente en una de ellas.

Este comportamiento pone de manifiesto que los contra-cationes de los distintos hidróxidos alcalinos influyen significativamente tanto en el flujo de los AINEs a través de la SLM, como en la selectividad de la técnica. Por lo tanto, la correcta elección de los mismos puede contribuir a mejorar notablemente los resultados. De hecho, si se comparan los factores de enriquecimiento que se obtienen al utilizar NaOH en ambas fases respecto de los obtenidos con el par óptimo KOH/NaOH, se observa que el rendimiento de la extracción aumenta considerablemente para todos los compuestos. Del mismo modo, la elección del o los hidróxidos alcalinos menos apropiados influirá negativamente en la eficacia del proceso. Esto último es lo que se observa al ajustar el pH de la fase donadora con NaOH y el de la aceptora con CsOH, pues con esta combinación los factores de enriquecimiento son entre un 48 y un 70% más bajos que los que resultan con los hidróxidos óptimos. Además, el hecho de que el par más idóneo para este estudio (KOH/NaOH) sea distinto del obtenido por P. Kubáň et al. (KOH/CsOH), en cuyo estudio se emplearon clorofenoles como analitos modelo, parece indicar que el hecho de que los resultados obtenidos sean mejores o peores no sólo va a depender de los contraiones presentes en el medio, sino también del tipo de compuestos que se quiera analizar.

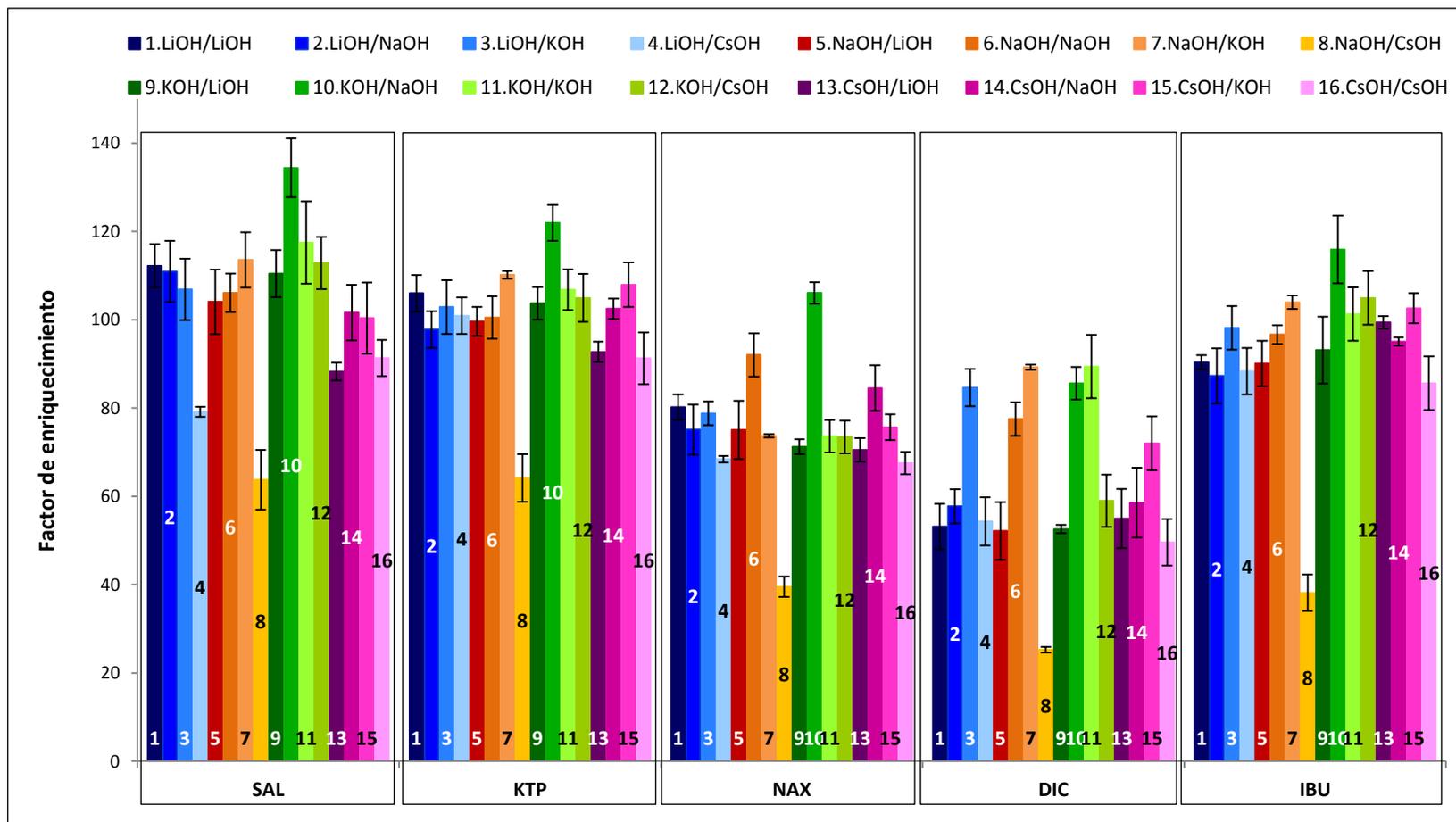


Figura 2.10. Efecto de los hidróxidos alcalinos en la extracción mediante electromembrana de AINEs estudiados. %RSD < 11%.

Tras completar el estudio sobre la composición de la fase donadora, se comprobaron nuevamente los valores óptimos para las restantes variables operacionales. Es decir, se analizó si los valores obtenidos en presencia de NaOH en la fase donadora, seguían siendo los óptimos o si, por el contrario, cambiaban al sustituir el NaOH por KOH. En ningún caso, se observó modificación alguna respecto de los resultados previamente obtenidos para dichas variables.

Finalmente, al comparar los resultados de este trabajo con los descritos en trabajos previos (Tabla 2.4), en los que se usa NaOH en ambas fases para la extracción electrocinética de AINEs, se comprueba que los factores de enriquecimiento obtenidos en este estudio son 4 veces más altos que los mejores que se conocen hasta la fecha [19].

Así pues, una vez optimizadas todas las variables experimentales, el procedimiento de extracción para los AINEs seleccionados consiste en aplicar una diferencia de potencial de 60 voltios durante 20 minutos a 25 mL de una disolución (pH 7; KOH) de concentración $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ que se agita continuamente a una velocidad constante de 600 rpm. Los compuestos se extrajeron en un volumen de fase aceptora de 50 μL (pH 12, NaOH 10 mM) utilizando 1-octanol como membrana líquida soportada. La intensidad de corriente media registrada en estas condiciones fue de 30 μA y los factores de enriquecimiento resultantes fueron 134 para SAL, 122 para KTP, 106 para NAX, 86 para DIC y 116 para IBU con %RSD < 7.5%.

Tabla 2.4. Comparación del método propuesto con estudios previos publicados.

| Condiciones de EME | | | | | |
|--------------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------|-----|
| Parámetros operacionales | M. Balchen et al. [28] | M. Ramos Payán et al. [19] | J.M. Kim et al. [43] | Método propuesto | |
| Longitud de la fibra | 31mm | 30 mm | 32 mm | 30 mm | |
| Modelo de fibra | Accurel® PP Q3/2 | Accurel® S6/2 | Accurel® PP/300/120 0 | Accurel® S6/2 | |
| Limpieza | Acetona | Acetona | Acetonitrilo | Acetona | |
| SLM | 1-heptanol | 1-octanol | 1-octanol | 1-octanol | |
| pH de la fase donadora | 12 (NaOH) | 12 (NaOH) | 7 (NaOH) | 7 (KOH) | |
| pH de la fase aceptora | 12 (NaOH) | 12 (NaOH) | 11 (5 mM NH ₄ ACo) | 12 (NaOH) | |
| Volumen de fase donadora | 0,3 mL | 10 mL | 1 mL | 25 mL | |
| Volumen de fase aceptora | 30 µL | 50 µL | n.d. | 50 µL | |
| Distancia entre los electrodos | n.d. | 3 mm | n.d. | 3 mm | |
| Tiempo (min) | 5 | 10 | 10 | 20 | |
| Factores de enriquecimiento | | | | | |
| | SAL | KTP | NAX | DIC | IBU |
| M. Balchen et al. [28] | - | 8.2 | 2.5 | 7.4 | 6.1 |
| M. Ramos Payán et al. [19] | 40 | 43 | 32 | 49 | 28 |
| J.M. Kim et al. [43] | - | 8 | 6 | - | 12 |
| Método propuesto | 134 | 122 | 106 | 85 | 116 |

2.3.2. Validación de la metodología propuesta

El procedimiento propuesto para la extracción mediante electromembrana de antiinflamatorios no esteroideos, se validó en términos de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud según la Guía Europea de Química Analítica (EURACHEM) [51]. Los resultados correspondientes a la validación del método se describen en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Resultados de la validación del procedimiento de EME propuesto.

| AINEs | Rango lineal (ng mL ⁻¹) | Linealidad | | LOD (ng mL ⁻¹) | LOQ (ng mL ⁻¹) | EF |
|------------------|--|-------------------|-------|-------------------------------|-------------------------------|-----|
| | | (r ²) | (%) | | | |
| SAL ^a | 0,3-500 | 0.998 | 98.62 | 0.1 | 0.3 | 134 |
| KTP ^b | 3-750 | 0.9982 | 98.72 | 1.5 | 3 | 122 |
| NAX ^a | 0,5-500 | 0.9973 | 98.43 | 0.2 | 0.5 | 106 |
| DIC ^b | 3-750 | 0.9987 | 98.92 | 1 | 3 | 86 |
| IBU ^a | 0,5-500 | 0.9977 | 98.51 | 0.2 | 0.5 | 116 |

^aDetección por FLD.

^bDetección por DAD.

Para evaluar la linealidad se elaboró una recta de calibrado externo de 12 puntos (obtenidos cada uno de ellos por triplicado) aplicando el procedimiento de extracción descrito en la sección anterior a disoluciones patrón de los AINEs seleccionados de concentraciones comprendidas entre 0.3 y 750 ng mL⁻¹. Como puede verse, se obtuvieron buenos resultados en términos de linealidad para cada uno de los compuestos en sus correspondientes rangos de concentración, con valores entre el 98.4% para NAX y el 98.9% para DIC expresados como porcentaje de linealidad y coeficientes de correlación $r^2 > 0.997$. Los límites de detección (LODs) y de

cuantificación (LOQs) se calcularon como la mínima cantidad de analito con la que se obtienen picos cuya relación señal/ruido es 3 para el límite de detección y 10 para el límite de cuantificación. Así, los elevados factores de enriquecimiento obtenidos permitieron determinar bajas concentraciones de los analitos estudiados ya que los LODs oscilaban entre 0.1 ng mL^{-1} para SAL y 1.5 ng mL^{-1} para KTP y los LOQs entre 0.3 ng mL^{-1} para SAL y 3 ng mL^{-1} para KTP y DIC.

Para determinar la precisión del método, se evaluaron la repetibilidad y la precisión intermedia. Para ello, se prepararon una serie de disoluciones patrón (por triplicado) de los compuestos estudiados a tres niveles de concentración comprendidos dentro del rango lineal (5, 50 y 500 ng mL^{-1}), se aplicó el procedimiento de extracción y se midieron las muestras en un sólo día, así como un día a la semana durante dos meses. De esta forma, se obtuvieron desviaciones estándar relativas (%RSD) entre 1-8% para la repetibilidad y entre 2-9% para la precisión intermedia.

La exactitud se evaluó mediante ensayos de recuperación de muestras de orina previamente diluidas con agua ultrapura (1:1000, v/v) y fortificadas con todos los compuestos a tres niveles de concentración bajos, medios y altos ($5, 50 \text{ y } 500 \text{ ng mL}^{-1}$) acordes a sus respectivos rangos lineales. Como puede verse en la Tabla 2.6, las recuperaciones fueron superiores al 80% y no se obtuvieron diferencias significativas entre las recuperaciones obtenidas para cada uno de los niveles de concentración ensayados en las muestras fortificadas, resultando porcentajes de desviación estándar relativas inferiores al 7%.

Tabla 2.6. Porcentaje de recuperación en muestras de orina diluidas (1:1000) y fortificadas con todos los AINES estudiados a tres niveles de concentración.

| Porcentaje de recuperación en orina ^a | | | | | |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Nivel dopado (ng mL ⁻¹) | SAL ^b | KTP ^c | NAX ^b | DIC ^c | IBU ^b |
| 5 | 99.9 ± 4.8 | 99.9 ± 2.9 | 85.6 ± 8.3 | 85.1 ± 4.0 | 95.8 ± 3.4 |
| 50 | 97.3 ± 7.7 | 101.5 ± 5.4 | 82.1 ± 6.8 | 91.4 ± 2.2 | 95.4 ± 2.3 |
| 500 | 99.7 ± 1.9 | 100.3 ± 3.1 | 88.2 ± 4.9 | 81.2 ± 1.9 | 99.5 ± 2.2 |

^aMedia correspondiente a tres determinaciones ± desviación estándar. %RSD < 7%.

^bDetección por FLD.

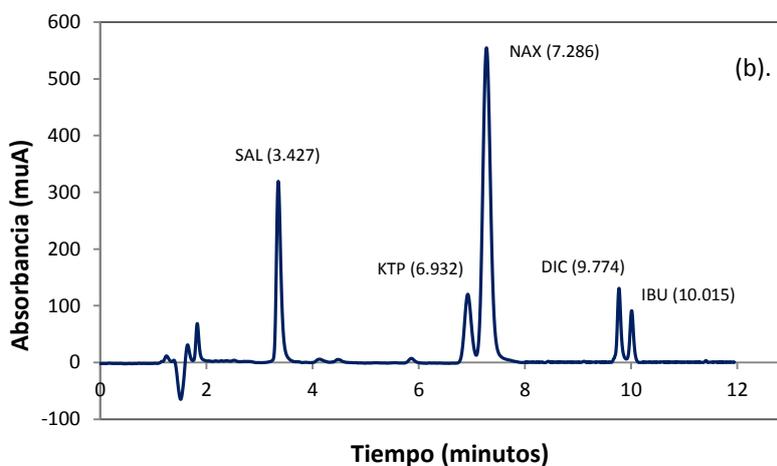
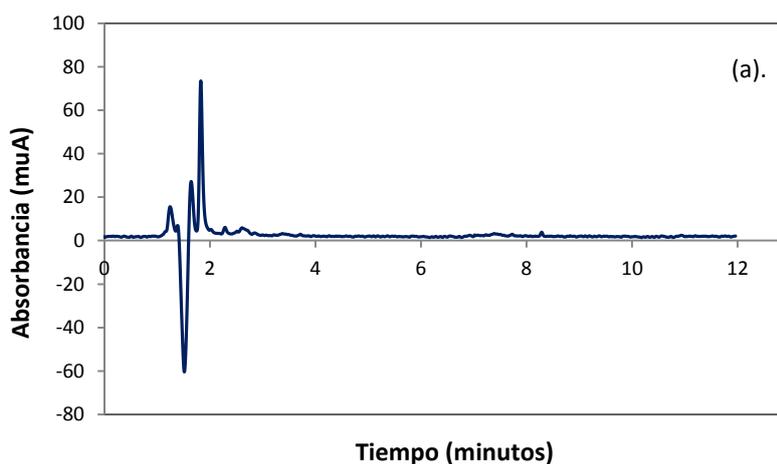
^cDetección por DAD.

De acuerdo con los parámetros de validación obtenidos, puede decirse que el método de extracción electrocinética propuesto proporciona buen rendimiento en términos de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

2.3.3. Aplicación a muestras de orina humana

Para comprobar si el procedimiento EME propuesto es adecuado para su aplicación en el análisis de muestras de orina humana procedentes de voluntarios bajo tratamiento médico. Dichas muestras, fueron convenientemente almacenadas a una temperatura de 4°C hasta el momento de su análisis. Se analizaron dos muestras que contenían NAX e IBU respectivamente y que fueron recogidas a las 3 horas de la administración oral de un comprimido de 550 mg de NAX (Cinfa[®]) en el primer caso y a las 7 horas de la administración oral de un comprimido de 600 mg de IBU (Normon[®]) en el segundo.

Para llevar a cabo el análisis, las muestras se diluyeron con agua ultrapura (1:1000, v/v), se microfiltraron (0.22 μm) y se sometieron, por triplicado, al procedimiento de EME propuesto para el análisis de los AINEs seleccionados. Finalmente, los extractos obtenidos se analizaron mediante HPLC-DAD/FLD. La Figura 2.11, muestra los cromatogramas correspondientes a: (a). blanco de orina humana, (b). muestra de orina humana fortificada con una mezcla de concentración 300 ng mL^{-1} de todos los fármacos estudiados, (c). muestra de orina recogida a las 3 horas de la ingesta de una dosis de 550 mg de NAX y (d). muestra de orina recogida a las 7 horas de la ingesta de una dosis de 600 mg de IBU.



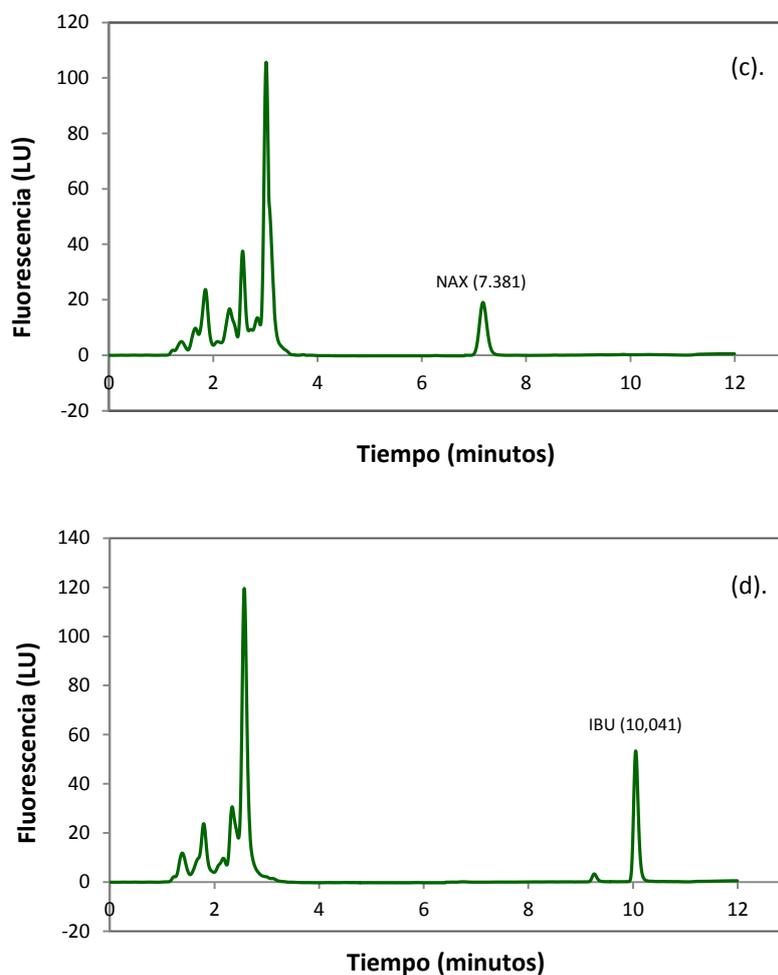


Figura 2.11. Cromatogramas de HPLC correspondientes a las muestras de orina humana sometidas al procedimiento de extracción electrocinética propuesto: (a). Blanco de orina (DAD, λ : 235 nm), (b). Orina fortificada con todos los compuestos a 300 ng mL^{-1} (DAD, λ : 235 nm), (c). Orina recogida a las 3 horas de la ingesta de una dosis de 550 mg de NAX (FLD), (d). Orina recogida a las 7 horas de la ingesta de una dosis de 600 mg de IBU (FLD).

Como puede verse, todos los cromatogramas presentan una buena línea base, así como picos bien definidos y resueltos para todos los compuestos. Además, en el intervalo de tiempo en el que aparecen los picos, no se observan señales adicionales que podrían corresponder a otros

compuestos presentes en la orina, lo que pone de manifiesto la buena selectividad del método así como la consecución de un excelente *clean-up*.

La concentración encontrada en las muestras de orina analizadas fue de $164 \pm 7 \text{ ng mL}^{-1}$ para el NAX y de $114 \pm 4 \text{ ng mL}^{-1}$ para el IBU. De acuerdo con los datos bibliográficos, estos contenidos se corresponden con los niveles de excreción esperados en el periodo de tiempo transcurrido desde la ingesta del fármaco hasta la recogida de la orina. Según la bibliografía, aproximadamente el 95% del naproxeno que se ingiere, sea cual sea la dosis administrada, se excreta a través de la orina. Entre un 66 y un 92% se excreta en forma de conjugados glucorónidos, mientras que el porcentaje restante lo hace como naproxeno libre y otras de sus formas metabólicas [52,53]. En el caso del IBU, aproximadamente un 10% de este fármaco se excreta en la orina como tal entre 6 y 8 horas después de la ingesta. El 90% restante se excreta como metabolitos o alguna de sus formas conjugadas [54,55].

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos y atendiendo a las buenas recuperaciones resultantes al fortificar las muestras de orina, puede decirse que el procedimiento de extracción mediante electromembrana propuesto ha demostrado ser adecuado para el análisis de los antiinflamatorios no esteroideos seleccionados en muestras de orina humana.

REFERENCIAS

- [1] C. Huang, Z. Chen, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, X. Shen, Electromembrane extraction, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 95 (2017) 47-56.

- [2] N. Drouin, P. Kubáň, S. Rudaz, S. Pedersen-Bjergaard, J. Schappler, Electromembrane extraction: Overview of the last decade, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 357-363.
- [3] S. Yaripour, M. Zaheri, A. Mohammadi, An electromembrane extraction-HPLC-UV analysis for the determination of valproic acid in human plasma, *J. Chinese Chem. Soc.* 65 (8) (2018) 989-994.
- [4] M. Forough, K. Farhadi, A. Eyshi, R. Molaei, H. Khalili, V.J. Kouzegaran, A.A. Matin, Rapid ionic liquid-supported nano-hybrid composite reinforced hollow-fiber electromembrane extraction followed by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis: An effective approach for extraction and quantification of Imatinib mesylate in human plasma, *J. Chromatogr. A* 1516 (2017) 21-34.
- [5] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 104-111.
- [6] C. Huang, H. Jensen, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Mass transfer in electromembrane extraction-The link .between theory and experiments, *J. Sep. Sci.* 39 (1) (2016) 188-197.
- [7] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrical potential can drive liquid-liquid extraction for sample preparation in chromatography, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 27 (10) (2008) 934-941.
- [8] A. Slamková, P. Kubáň, P. Boček, Quantitative aspects of electrolysis in electromembrane extractions of acidic and basic analytes, *Anal. Chim. Acta* 887 (2015) 92-100.
- [9] P.R. Danesi, E.P. Horwitz, P.G. Rickert, Rate and mechanism of facilitated americium (III) transport through a supported liquid membrane containing a bifunctional organophosphorous mobile carrier, *J. Phys. Chem.* 87 (23) (1983) 4708-4715.

[10] R.E.G. Jamt, A. Gjelstad, L.E.E. Eibak, E.L. Øiestad, A.S. Christophersen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of stimulating drugs from undiluted whole blood, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 27-36.

[11] H.H. See, P.C. Hauser, Electric field-driven extraction of lipophilic anions across a carrier-mediated polymer inclusion membrane, *Anal. Chem.* 83 (19) (2011) 7507-7513.

[12] M. Balchen, H. Jensen, L. Reubsaet, S. Pedersen-Bjergaard, Potential-driven peptide extractions across supported liquid membranes: investigation of principal operational parameters, *J. Sep. Sci.* 33 (11) (2010) 1665-1672.

[13] C. Huang, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Exhaustive extraction of peptides by electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 853 (2015) 328-334.

[14] L. Strieglerová, P. Kubáň, P. Boček, Rapid and simple pretreatment of human body fluids using electromembrane extraction across supported liquid membrane for capillary electrophoretic determination of lithium, *Electrophoresis* 32 (10) (2011) 1182-1189.

[15] S.S. Nasrollahi, S.S.H. Davarani, H.R. Moazami, Impedometric investigation of salt effects on electromembrane extraction: Practical hints for pH adjustment, *Electrochimica Acta* 296 (2019) 355-363.

[16] K.F. Seip, H. Jensen, T.E. Kieu, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Salt effects in electromembrane extraction, *J. Chromatogr. A* 1347 (2014) 1-7.

[17] M.S. Restan, H. Jensen, X. Shen, C. Huang, Ø.G. Martinsen, P. Kubáň, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Comprehensive study of buffer systems and local pH effects in electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 984 (2017) 116-123.

[18] A. Šlampová, P. Kubáň, P. Boček, Effects of selected operational parameters on efficacy and selectivity of electromembrane extraction. Chlorophenols as model analytes, *Electrophoresis* 35 (17) (2014) 2429-2437.

- [19] M. Ramos Payán, M.A. Bello López, R. Fernández-Torres, M. Villar-Navarro, M. Callejón-Mochón, Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples, *Talanta* 85 (1) (2011) 394-399.
- [20] M. Rezazadeh, Y. Yamini, S. Seidi, Electrically stimulated liquid-based extraction techniques in bioanalysis, *Bioanalysis* 8 (2016) 815-828.
- [21] M. Ghambarian, Y. Yamini, A. Esrafil, Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications, *Microchimica Acta* 177 (3-4) (2012) 271-294.
- [22] Z. Es'haghi, Z. Rezaeifar, G.H. Rounaghi, Z.A. Nezhadi, M.A. Golsefid, Synthesis and application of a novel solid-phase microextraction adsorbent: Hollow fiber supported carbon nanotube reinforced sol-gel for determination of phenobarbital, *Anal. Chim. Acta* 689 (1) (2011) 122-128.
- [23] T.T. Ho, C.Y. Chen, Z.G. Li, T.C.C. Yang, M.R. Lee, Determination of chlorophenols in landfill leachate using headspace sampling with ionic liquid-coated solid-phase microextraction fibers combined with gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 712 (2012) 72-77.
- [24] X. Li, Z. Zeng, Y. Chen, Y. Xu, Determination of phthalate acid esters plasticizers in plastic by ultrasonic solvent extraction combined with solid-phase microextraction using calix[4]arene fiber, *Talanta* 63 (4) (2004) 1013-1019.
- [25] A. Gjelstad, Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction and parallel artificial liquid membrane extraction, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 25-31.
- [26] E. Thordarson, S. Pálmarsdóttir, L. Mathiasson, J.Å. Jönsson, Sample preparation using a miniaturized supported liquid membrane device connected on-line to packed capillary liquid chromatography, *Anal. Chem.* 68 (15) (1996) 2559-2563.

- [27] A. Gjelstad, H. Jensen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Kinetic aspects of hollow fiber liquid-phase microextraction and electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 742 (2012) 10-16.
- [28] M. Balchen, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane, *J. Chromatogr. A* 1152 (1-2) (2007) 220-225.
- [29] C. Huang, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Organic solvents in electromembrane extraction: recent insights, *Rev. Anal. Chem.* 35 (4) (2016) 169-183.
- [30] H. Hansson, U. Nilsson, Assessment of a dynamic hollow-fiber liquid phase microextraction system for human blood plasma samples, *Talanta* 77 (4) (2009) 1309-1314.
- [31] T.G. Halvorsen; S. Pedersen-Bjergaard; K.E. Rasmussen, Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction, *J. Chromatogr. B* 760 (2) (2001) 219-226.
- [32] D.F. de Freitas, C.E. Porto, E.P. Vieira, M.E. de Siqueira, Three-phase, liquid-phase microextraction combined with HPLC fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (1) (2010) 170-177.
- [33] K.M. Al Azzam, A. Makahleah, B. Saad, Bahruddin, S.M. Mansor, Hollow fiber liquid-phase microextraction for the determination of trace amounts of rosiglitazone (anti-diabetic drug) in biological fluids using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatographic methods, *J. Chromatogr. A* 1217 (23) (2010) 3654-3659.
- [34] M.R. Payán, M.A. Bello-López, R. Fernández-Torres, M.Villar-Navarro, M. Callejón-Mochón, Hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) of ibuprofen followed by FIA-chemiluminescence determination using the acidic permanganate-sulfite system, *Talanta* 79 (3) (2009) 911-915.

- [35] F.J. Malagueño de Santana, A.R. Moraes de Oliveira, P. Sueli Bonato, Chiral liquid chromatographic determination of mirtazapine in human plasma using two-phase liquid-phase microextraction for sample preparation, *Anal. Chim. Acta* 549 (1-2) (2005) 96-103.
- [36] C. Basheer, H.K. Lee, Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1057 (1-2) (2004) 163-169.
- [37] C. Basheer, H.K. Lee, J.P. Obbard, Application of liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polychlorinated biphenyls in blood plasma, *J. Chromatogr. A* 1022 (1-2) (2004) 161-169.
- [38] L. Meng, W. Zhang, P. Meng, B. Zhu, K. Zheng, Comparison of hollow fiber liquid-phase microextraction and ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of drugs of abuse in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 989 (2015) 46-53.
- [39] J.X. Wang, D.Q. Jiang, X.P. Yan, Determination of substituted benzenes in water samples by fiber-in-tube liquid phase microextraction coupled with gas chromatography, *Talanta* 68 (3) (2006) 945-950.
- [40] P.S. Chen, S. Da Huang, Determination of ethoprop, diazinon, disulfoton and fenthion using dynamic hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 69 (3) (2006) 669-675.
- [41] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids, *J. Chromatogr. A* 1109 (2) (2006) 183-190.
- [42] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances, *J. Chromatogr. A* 1124 (1-2) (2006) 29-34.

[43] J.M. Kim, S.W. Myung, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by HPLC-UV/Vis analysis coupled with electromembrane extraction, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 39 (2018) 335-340.

[44] A. Gjelstad, T.M. Andersen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields, *J. Chromatogr. A* 1157 (1-2) (2007) 38-45.

[45] S. Seidi, Y. Yamini, A. Heydari, M. Moradi, A. Esrafil, M. Rezazadeh, Determination of thebaine in water samples, biological fluids, poppy capsule, and narcotic drugs, using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography analysis, *Anal. Chim. Acta* 701 (2018) 181-188.

[46] M. Balchen, L. Reubsaet, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of peptides, *J. Chromatogr. A* 1194 (2) (2008) 143-149.

[47] P. Kubáň, L. Strieglerová, P. Gebauer, P. Boček, Electromembrane extraction of heavy metal cations followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Electrophoresis* 32 (9) (2011) 1025-1032.

[48] Y. Yamini, S. Seidi, M. Rezazadeh, Electrical field-induced extraction and separation techniques: promising trends in analytical chemistry-A review, *Anal. Chim. Acta* 814 (2014) 1-22.

[49] S. Nojavan, A. R. Fakhari, Electro membrane extraction combined with capillary electrophoresis for the determination of amlodipine enantiomers in biological samples, *J. Sep. Sci.* 33 (20) (2010) 3231-3238.

[50] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances, *J. Chromatogr. A* 1124 (1-2) (2006) 29-34.

[51] B. Magnusson, U. Örnemark (eds.), Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Second ed. 2014. ISBN 978-91-87461-59-0.

[52] R. Runkel, M. Chaplin, G. Boost, E. Segre, E. Forchiell, Absorption, distribution, metabolism and excretion of naproxen in various laboratory animals and human subjects, J. Pharm. Sci. 61 (1972) 703-708.

[53] N.M. Davies, K.E. Anderson, Clinical pharmacokinetics of Naproxen, Clinical Pharmacokinetics 32 (4) (1997) 268-293.

[54] R. Bushra, N. Aslam, An overview of clinical pharmacology of ibuprofen, Oman Medical Journal 25 (3) (2010) 155-161.

[55] E.J. Antal, C.E. Wright, B.L. Brown, K.S. Albert, L.C. Aman, N.W. Levin, The influence of hemodialysis on the pharmacokinetics of ibuprofen and its major metabolites, J. Clin. Pharmacol. 26 (3) (1986) 184-190.

CAPÍTULO 3. Comparación de la eficacia de la extracción mediante electromembrana de antiinflamatorios no esteroideos empleando distintos dispositivos.

CHAPTER 3. SUMMARY

In this chapter, the extraction efficiency of three different EME setups is evaluated and compared. The employed setups are as follows: a configuration based on the use of hollow fibers as support for the liquid membrane (HF-EME), a microfluidic device (μ F-EME) and the last one is a new setup that employs flat membranes as supports (FM-EME).

The systems have been used to carry out the electromembrane extraction of five non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in aqueous samples: salicylic acid (SAC), ketoprofen (KTP), naproxen (NAX), diclofenac (DIC) and ibuprofen (IBU), using a chromatographic separation with UV and fluorescence detection (HPLC/UV-DAD-FLD) for the determination of the selected analysed drugs.

The composition of the SLM, volume, pH of donor and acceptor phases, applied voltage and extraction time were investigated to achieve the maximum extraction efficiency. Once the optimization was carried out, the target analytes were successfully extracted performing the EME procedure using 1-octanol as SLM in all cases and applying the optimum conditions for each setup as follows:

- HF-EME device: 60 volts for 20 minutes to an aqueous donor solution at pH 7 (KOH adjusted) continuously stirred at a speed of 600 rpm. The analytes were extracted into 50 μ L of an acceptor solution at pH 12 (NaOH 10 mM adjusted).

- μ F-EME device: 10 volts for 10 minutes to an aqueous donor solution at pH 9 (KOH adjusted) pumped at a $15 \mu\text{L min}^{-1}$ flow. 150 μL of an aqueous solution (pH 10; ammonium/ammonium chloride buffer 30 mM) was used as acceptor phase.

- FM-EME device: 80 volts for 12 minutes to an aqueous donor solution at pH 5.2 (unadjusted pH) continuously stirred at a speed of 400 rpm. The analytes were extracted into 250 μL of an aqueous acceptor solution at pH 12 (NaOH 10 mM adjusted).

Finally, the obtained results, in terms of enrichment factors and extraction recoveries, were discussed to determine the advantages and disadvantages associated to the use of one or another system depending on the analysed sample. Likewise, the three different proposed EME methods were successfully applied to the determination of the target analytes in fortified human urine samples.

Los sistemas de extracción mediante electromembrana se encuentran en continua evolución a fin de introducir mejoras que permitan obtener sistemas más eficaces y que, al mismo tiempo, resuelvan algunos de los problemas o inconvenientes que lleva asociados esta técnica de extracción. Algunas de estas nuevas configuraciones tienen como objetivo principal la reducción del tamaño de los dispositivos así como la automatización de los métodos de extracción, lo cual permitiría reducir el consumo de reactivos así como el volumen de disolventes orgánicos y de muestras que precisa cada análisis.

En ese sentido, han ido apareciendo numerosas alternativas al esquema original de EME, entre las que destacan los sistemas que sustituyen el uso de fibras huecas por láminas planas como soporte para la membrana líquida. El empleo de fibras huecas como soporte, es el formato más extendido debido a que la propia fibra actúa como compartimento para la fase aceptora y, fundamentalmente, a que permite obtener elevados factores de enriquecimiento gracias a la elevada relación de volúmenes que existe entre las fases donadora y aceptora. Sin embargo, los problemas de estabilidad que a menudo plantea el reducido volumen interno de la fibra, han propiciado el desarrollo de otros dispositivos y modos operacionales que implican el uso de soportes con una geometría plana para la SLM con objeto de minimizar algunos de los inconvenientes asociados al uso de fibras huecas. Todo ello, unido al interés que ha despertado en los últimos años la miniaturización de los dispositivos, ha

dado lugar al desarrollo de sistemas de EME que emplean dispositivos microfluídicos como unidades de extracción [1-7].

La tecnología microfluídica se basa en el diseño y la fabricación de dispositivos que procesan o manejan volúmenes de fluidos del orden de los microlitros mediante canales bien definidos que permiten un control preciso del flujo que los atraviesa. Se trata de microsistemas que integran las operaciones de preparación y tratamiento de muestras en un dispositivo tipo chip en el que las fases donadora y/o aceptora se renuevan continuamente, lo que los convierte en herramientas muy atractivas que pueden encontrar aplicación en diversas áreas de la ciencia y la ingeniería, especialmente en los campos de análisis químico, clínico, bioquímico y biológico [8-11]. Dependiendo de que sólo una o las dos fases se encuentren en movimiento, se distinguen dos modos de operación principales: modo dinámico o de doble flujo, en el que ambas fases son impulsadas continuamente a través del sistema y el modo semi-dinámico o de medio flujo, en el que la fase donadora mantiene el régimen dinámico mientras que la aceptora pasa a un régimen estático.

De este modo, el diseño de dispositivos microfluídicos ha cobrado especial atención en el ámbito de la química analítica debido a las numerosas ventajas que ofrecen desde el punto de vista económico y medioambiental [4]. Así pues, la implementación de la extracción líquido-líquido en sistemas microfluídicos ha permitido no sólo reducir significativamente el consumo de disolventes orgánicos (3-5 μL) y de muestras, sino también obtener una transferencia de masa más rápida y sin necesidad de agitación debido a las menores distancias de difusión entre las fases implicadas en el proceso. Estos dispositivos, además, son

reutilizables, fáciles de manejar y ofrecen la posibilidad de automatización o integración mediante el acoplamiento con las técnicas instrumentales de análisis, lo que se traduce en una disminución de los tiempos y los costes de operación [6, 12-16].

A pesar de los avances realizados [17], la aplicación de la tecnología microfluídica en los procedimientos de EME se encuentra aún en desarrollo, de modo que las posibles orientaciones futuras podrían centrarse en el diseño de microsistemas que integren las etapas de preparación, separación y detección de muestras en un único dispositivo y que puedan llegar a ser portátiles.

Además de los dispositivos microfluídicos, se conocen también otros sistemas de EME que utilizan soportes planos para la inmovilización del disolvente orgánico y que se caracterizan porque operan en condiciones completamente estáticas. Su diseño, generalmente, lleva asociado la modificación tanto de la configuración como de la geometría de los electrodos. En función de la relación de volúmenes entre las fases donadora y aceptora, estos sistemas pueden ser dos tipos: por un lado están los que permiten la extracción exhaustiva de los compuestos presentes en la muestra, aunque no ofrecen la posibilidad de preconcentración [18-20] y por otro, aquellos en los que la preconcentración de los analitos es posible debido a que el volumen de la fase aceptora es inferior al de la fase donadora [21-24].

Si bien, el área superficial de los soportes planos es mucho menor en comparación con el que ofrecen las fibras huecas, el propio funcionamiento de los dispositivos que incorporan soportes planos para la

inmovilización de la SLM permite mejorar la robustez y la reproducibilidad de los procedimientos de EME. No obstante, hay que tener en cuenta que proporcionan una relación de volúmenes que suele ser significativamente inferior a la de los sistemas que emplean fibras huecas, dando como resultado una disminución en los factores de enriquecimiento.

Como puede verse, cada dispositivo ofrece una serie de ventajas e inconvenientes relacionados, principalmente, con su diseño, por lo que la elección de uno u otro va a depender, en última instancia, del tipo de análisis que se desee realizar.

Considerando todo lo anteriormente mencionado, el objetivo de este capítulo es analizar y evaluar la eficacia de la extracción, en términos de factores de enriquecimiento y porcentajes de recuperación, de tres dispositivos experimentales que difieren completamente en lo que a forma, geometría y estructura se refiere. El primero presenta una configuración clásica en la que se utilizan fibras huecas como soporte para la membrana líquida (HF-EME), el segundo es un dispositivo microfluídico (μ F-EME) y el tercero implica una configuración muy poco empleada y que precisa el uso de soportes de geometría plana (FM-EME).

Se compararán los resultados obtenidos con cada sistema en la determinación de cinco fármacos pertenecientes a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): ácido salicílico (SAL), ketoprofeno (KTP), naproxeno (NAX), diclofenaco (DIC) e ibuprofeno (IBU). La elección de estos compuestos se debe, esencialmente, a que la mayoría de los procedimientos de EME descritos para la determinación de fármacos ácidos emplean una configuración clásica, mientras que las nuevas

configuraciones para la extracción electrocinética de este tipo de compuestos han recibido una menor atención. Por último, se discutirán las ventajas e inconvenientes que lleva asociado el uso de cada uno de los sistemas propuestos.

A fin de conocer cuáles son las condiciones experimentales que hacen que el rendimiento de extracción sea el máximo posible para cada sistema, se han de optimizar previamente todos aquellos parámetros operacionales que influyen en la migración electrocinética de los analitos seleccionados. Este estudio se llevará a cabo para las dos configuraciones que requieren el uso de soportes planos para fijar la SLM. Para el dispositivo que usa la fibra hueca como soporte, se utilizarán los resultados previamente obtenidos en el capítulo 2 de esta Memoria.

De este modo, el presente capítulo se ha dividido en tres partes. En las dos primeras describe la optimización de los procedimientos de extracción mediante electromembrana para los dispositivos μ F-EME y FM-EME, respectivamente. En la tercera y última parte se presenta el análisis y la discusión de los resultados obtenidos con cada uno de los tres sistemas de extracción propuestos.

3.1. DESCRIPCIÓN DE LOS DISPOSITIVOS EMPLEADOS

3.1.1. Extracción mediante electromembrana utilizando un dispositivo microfluídico (μ F-EME)

En este apartado, se describe la optimización de un procedimiento de extracción electrocinética empleando un sistema que implica el uso de un

dispositivo microfluídico. Dada la geometría de este tipo de sistemas, el uso de fibras huecas como soportes para la membrana líquida es inviable, de modo que para la inmovilización de la SLM, se emplearon soportes comerciales de polipropileno pero que se presentan en forma de delgadas láminas planas.

El dispositivo experimental empleado se representa en las Figuras 3.1 y 3.2. Está formado por dos placas fabricadas en polimetilmetacrilato (PMMA), que se acoplan entre sí. Cada una de ellas, presenta un canal o depósito en el que se sitúan, respectivamente, las fases donadora y aceptora, las cuales se separan entre sí mediante una lámina plana de polipropileno que actúa como soporte para el disolvente orgánico que se utiliza como membrana líquida.

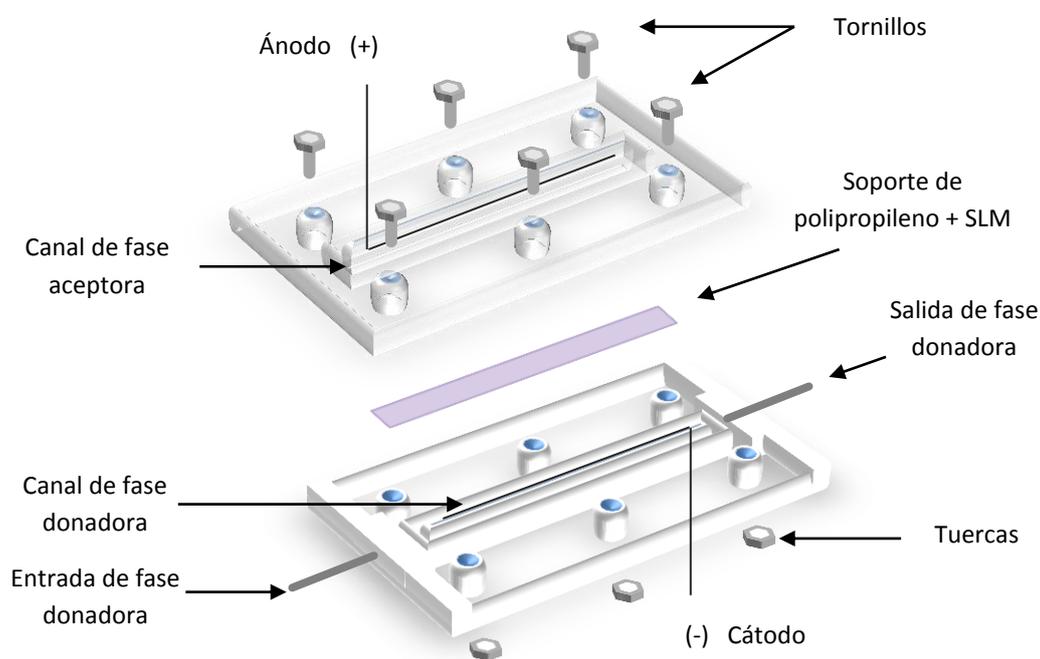


Figura 3.1. Esquema del dispositivo microfluídico (μ F-EME).

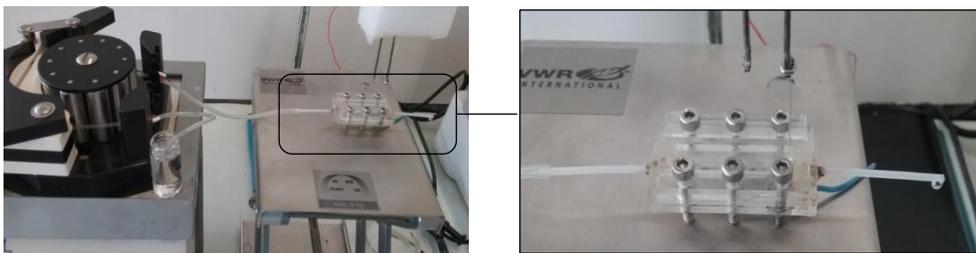


Figura 3.2. Imagen real del dispositivo microfluídico en funcionamiento.

El dispositivo se fabricó manualmente utilizando un sistema de fresado de alta precisión (Roland, MDX- 40a). Se seleccionó PMMA para su fabricación debido a que es un material de fácil mecanizado y, a la vez, lo suficientemente rígido como para asegurar la estabilidad del dispositivo y evitar que se deforme. Además, su precio no es muy elevado, no contiene prácticamente imperfecciones en su superficie y, lo más importante, es inerte a los compuestos que se analizan de forma habitual por EME, lo que garantiza que éstos no van a interactuar o a ser adsorbidos por este material.

Se trata de un dispositivo que opera en modo semi-dinámico, pues mientras que la fase donadora está en continuo movimiento y se renueva durante el tiempo que dura la extracción, la fase aceptora se mantiene completamente estática. La fase donadora circula por el canal de la placa inferior, que tiene unas dimensiones de 27 mm de largo x 2 mm de ancho x 2 mm de profundidad, mientras la fase aceptora se coloca en el canal correspondiente a la placa superior, que tiene unas dimensiones de 27 mm de largo x 2 mm de ancho x 4 mm de profundidad. La placa inferior presenta dos orificios, uno en cada extremo del canal, de 1.5 mm de diámetro y que permiten el flujo de la fase donadora. Para facilitar la entrada y la salida de la misma, se acopló en cada orificio un pequeño tubo

de teflón. Adicionalmente, se perforó un pequeño orificio de 0.25 mm de diámetro en la parte inferior del canal de la fase donadora para colocar el hilo de platino que sirve como electrodo y que, en este caso concreto, va incorporado de forma permanente en la placa por la que circula la fase donadora. Esta operación no se precisa en el canal destinado a la fase aceptora puesto que, al situarse en la parte superior del sistema, el electrodo correspondiente se puede colocar fácilmente en el interior del mismo de una extracción a otra. Tal y como puede verse en la imagen, cada placa consta, además, de 6 orificios, tres en cada uno de sus laterales, que son los que permiten cerrar el dispositivo. Las dimensiones finales de éste tras su montaje son de 40 mm de largo x 23 mm de ancho x 8 mm de alto.

Para llevar a cabo la extracción, en primer lugar, se cortó una lámina de polipropileno de 6 mm x 33 mm y se impregnó con 4 μL de 1-octanol, disolvente que se utilizó como membrana líquida soportada. A continuación, la lámina se colocó sobre el canal de la fase aceptora y las dos placas de PMMA se acoplaron y se fijaron mediante seis tornillos y tuercas. Para sellar el dispositivo y evitar o prevenir posibles fugas, se empleó una junta de polidimetilsiloxano (PDMS) de 1 mm de espesor que se situó entre ambos canales junto con el soporte de polipropileno.

Una vez hecho el correspondiente montaje, el dispositivo se acopló a una bomba peristáltica (Miniplus[®]3, Gilson), que era la encargada de mantener en movimiento a la fase donadora durante todo el procedimiento de extracción, y se colocaron 150 μL de fase aceptora en el canal superior junto con el segundo electrodo de platino. Finalmente, la disolución donadora con los analitos de interés se hizo pasar a través del sistema a un flujo de 15 $\mu\text{L min}^{-1}$.

A continuación, los electrodos se conectaron a una fuente de voltaje (VWR International, West Chest, Pensilvania, EEUU) y se aplicó la diferencia de potencial necesaria para originar la migración electrocinética de los compuestos desde la fase donadora a la aceptora. Al finalizar la extracción, la fuente se desconectó y se recogieron los 150 μL de fase aceptora, de los cuales 20 μL se inyectaron directamente en el sistema cromatográfico para su análisis. El análisis de los compuestos seleccionados se realizó utilizando el mismo equipamiento y método de separación cromatográfico descritos en el apartado 2.1.

La intensidad de corriente generada durante todo el procedimiento se registró (un dato cada 0.5 segundos) conectando en serie al sistema un multímetro digital (Peack Tech® modelo 3430, Ahrensburg, Alemania) que, a su vez, iba conectado a un ordenador en el que se almacenan los datos.

Dado que estos sistemas ofrecen la posibilidad de ser reutilizados tantas veces como sea necesario, al finalizar el proceso el dispositivo se desmontaba, se desechaba el soporte y, antes de colocar uno nuevo, los canales y la junta de PDMS se limpiaban con agua ultrapura para eliminar los restos del disolvente orgánico y de las disoluciones acuosas.

3.1.1.1. Elección del soporte plano

El uso de dispositivos microfluídicos en procedimientos de extracción mediante electromembrana, lleva implícito el uso de soportes con una estructura plana para fijar la membrana líquida. Se conocen una gran variedad de soportes planos con diferentes estructuras, propiedades de transporte y mecanismos de separación [25]. Según la naturaleza química y

el tipo de polímero que las componen, se pueden distinguir dos tipos de soportes: hidrofóbicos e hidrofílicos. Entre ellos cabe destacar los soportes de polipropileno, las membranas de gel de agarosa, los films de agar con nanopartículas de plata [21], los tejidos nanoestructurados o Tiss-OH® [22], las membranas de inclusión polimérica (*polymer inclusion membranes, PIMs*) [23] y las membranas de quitosano [24].

Al igual que ocurría con las fibras huecas, los soportes planos de polipropileno son los que se utilizan con mayor frecuencia debido, fundamentalmente, a su disponibilidad a nivel comercial y a su reducido coste. Esto último, es de gran importancia ya que permite desechar el material tras cada uso, evitando así fenómenos nada deseables de contaminación cruzada que suelen estar presentes en aquellos métodos que utilizan soportes reutilizables. Por otra parte, las propias características de este material, hacen que se pueda emplear en combinación con una amplia gama de disolventes orgánicos sin poner en juego su integridad. Así mismo, cuentan con una superficie específica elevada y una estructura porosa que facilita la inmovilización homogénea y uniforme de dichos disolventes mediante fuerzas capilares, lo que las hace muy adecuadas para este tipo de aplicaciones.

A nivel comercial, existen una amplia gama de soportes planos de polipropileno que se diferencian según su espesor, densidad, tamaño de poro y nivel de porosidad. Para este estudio se utilizaron láminas de polipropileno de 25 μm de espesor, un 55% de porosidad y un tamaño de poro promedio de 0.21 μm x 0.05 μm (Celgard 2500 micro-porous membrane, Celgard, Charlotte, CN, EEUU) como soporte para la SLM, pues según la bibliografía, además de ser las que se emplean con mayor

frecuencia, son las que proporcionan los mejores resultados en términos de eficacia de extracción [26].

En la Figura 3.3, se muestran las imágenes correspondientes a la (a). sección transversal así como a (b). la estructura porosa superficial de este tipo de membranas. Ambas imágenes se han obtenido por microscopía electrónica de barrido (SEM) mediante un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (FEGSEM) FEI TENE0 del Servicio de Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

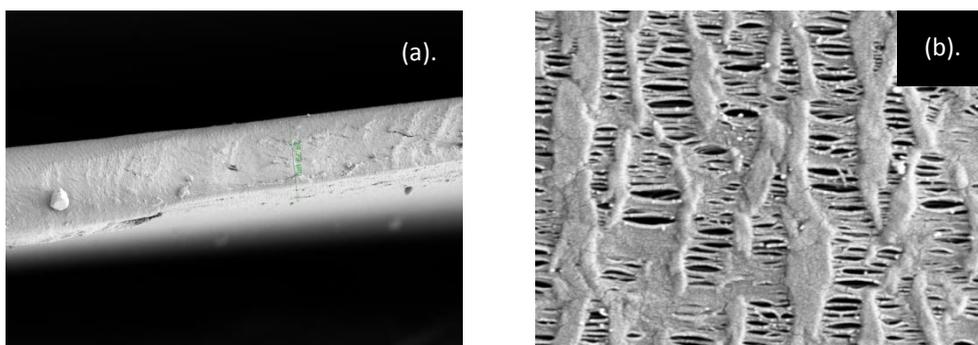


Figura 3.3. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) correspondientes a: (a). sección transversal y (b). estructura porosa superficial del soporte plano de polipropileno.

3.1.1.2. Elección de la membrana líquida soportada

En todos los procedimientos de extracción electrocinética, el primer paso lo constituye siempre la elección del disolvente orgánico que más se adecúe para ser utilizado como membrana líquida en la extracción de los compuestos de interés. La principal razón de esto es que la composición de

la membrana líquida determina, en gran medida, la eficacia y la selectividad del proceso, de modo que las condiciones operacionales de extracción así como los resultados obtenidos pueden variar significativamente dependiendo de la naturaleza del disolvente orgánico seleccionado.

El estudio que se describe a lo largo de este capítulo, permitirá comparar los resultados obtenidos cuando se utilizan diferentes sistemas de EME para la extracción de un mismo grupo de compuestos para, posteriormente, evaluar cuál de ellos es el más efectivo en lo que a eficacia de extracción se refiere. Por lo tanto, parece lógico pensar que el disolvente orgánico que se ha de utilizar como membrana líquida debe ser el mismo en todos los sistemas para así garantizar que la interacción analito-disolvente sea siempre la misma. Es decir, el uso del mismo disolvente orgánico como SLM en todos los dispositivos, asegura que algunas de las propiedades de éste que influyen significativamente en el transporte de materia, como la hidrofobicidad, la volatilidad, la conductividad eléctrica y la viscosidad, van a contribuir por igual a la migración electrocinética en todos los casos. Así, en estas condiciones, el paso de los analitos de una fase a otra dependerá únicamente de los valores del resto de variables operacionales, los cuales, a su vez, vendrán determinados por la configuración, la geometría y el funcionamiento del propio sistema de extracción que se esté analizando.

Teniendo en cuenta que en el estudio descrito en el capítulo 2 el disolvente seleccionado como óptimo fue el 1-octanol, será éste el que se emplee como SLM para el resto de los ensayos. Además, la propia experiencia así como los buenos resultados obtenidos en trabajos previos

desarrollados en el propio Grupo de Investigación, avalan la idoneidad de este disolvente como membrana líquida para la extracción electrocinética de antiinflamatorios no esteroideos [21,23,24,27].

3.1.1.3. Optimización de los parámetros operacionales del procedimiento de extracción

Para la optimización de los parámetros operacionales, se seleccionaron, como punto de partida algunas de las condiciones operacionales óptimas obtenidas con el sistema que emplea fibras huecas como soporte para la SLM. De este modo, el pH de la fase donadora se fijó a un valor de 7 utilizando KOH y el de la fase aceptora a 12 con una disolución de NaOH 10 mM. Para llevar a cabo la extracción se empleó un flujo de fase donadora de $10 \mu\text{L min}^{-1}$, el volumen de la fase aceptora se estableció en 150 μL y se aplicó una diferencia de potencial de 60 voltios durante 20 minutos utilizando 1-octanol como SLM.

Sin embargo, con estas condiciones de voltaje, la corriente eléctrica que se generaba era considerablemente alta, alcanzando, en la mayoría de los casos, valores promedios comprendidos entre los 400 y los 500 μA . Como resultado, se perdía la estabilidad del sistema debido a un exceso de electrolisis, puesto que se formaban burbujas tanto en la fase donadora como en la aceptora y el pH de las mismas no se mantenía constante al finalizar el proceso. Para solventar este comportamiento, se redujo el voltaje de extracción a un valor de 10 voltios, manteniendo los mismos valores para el resto de condiciones operacionales. Aunque la intensidad de corriente promedio se redujo considerablemente y el pH de la fase aceptora se mantuvo constante, no ocurría lo mismo con el de la fase

donadora, que aumentaba hasta un valor final de 12, observándose, además, la formación de burbujas en la misma. Por lo tanto, las condiciones operacionales de partida se modificaron y los primeros estudios se llevaron a cabo fijando el pH de ambas fases a un valor de 12, utilizando KOH 10 mM para la fase donadora y NaOH 10 mM para la fase aceptora, y se aplicó un voltaje de 10 voltios durante 10 minutos. Por su parte, el flujo de fase donadora se mantuvo en $10 \mu\text{L min}^{-1}$ y el volumen de la fase aceptora se fijó en 150 μL . En este último caso, el diseño del propio dispositivo microfluídico no permitía usar volúmenes inferiores a 150 μL , por lo que el volumen de fase aceptora se fijó a este valor durante todo el estudio. Todos los ensayos, se realizaron utilizando como fase donadora disoluciones acuosas de concentración $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ en todos los AINEs objeto de estudio.

A partir de estas condiciones y, con objeto de alcanzar la mayor eficacia de extracción posible para los analitos seleccionados, se optimizaron distintas variables operacionales tales como el flujo de la fase donadora, el pH de las fases donadora y aceptora, el voltaje aplicado y el tiempo de extracción.

3.1.1.4. Optimización del flujo de fase donadora

La velocidad de flujo de la fase donadora juega un papel esencial en la cinética y en la eficacia de la extracción, ya que contribuye a reducir el espesor de la doble capa que se forma alrededor de la SLM, aumentando así la transferencia de masa [3].

El flujo de fase donadora se evaluó para valores comprendidos entre 10 y 175 $\mu\text{L min}^{-1}$. Como puede verse en la Figura 3.4, las recuperaciones de extracción disminuían drásticamente por encima de los 15 $\mu\text{L min}^{-1}$ para todos los analitos, manteniéndose prácticamente constante por encima de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ para IBU y por encima de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ para el resto de los compuestos.

Este comportamiento se debe a que, a medida que aumenta el flujo de la fase donadora, se produce una disminución en el tiempo de residencia de los compuestos en el sistema. Es decir, al aumentar el flujo aumenta la velocidad de paso de los analitos a través del canal por el que circula la fase donadora de forma que entran y salen tan rápido del sistema que prácticamente no tienen tiempo suficiente para establecer contacto con la membrana líquida y pasar a la fase aceptora a través de ésta. Como resultado, se produce una disminución en la eficacia de la extracción. Por otra parte, flujos de fase donadora elevados conducen a una menor estabilidad del sistema debido a que gran parte del disolvente orgánico que separa ambas fases se pierde al ser arrastrado por el rápido movimiento de la fase donadora [3-5].

Por lo tanto, 15 $\mu\text{L min}^{-1}$ se seleccionó como valor óptimo para el flujo de fase donadora, ya que a éste valor se obtuvieron las mayores recuperaciones de extracción para casi todos los AINEs estudiados (SAL, KTP, NAX y DIC). Las recuperaciones en el caso de IBU fueron mayores a flujo 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ (81%) frente a flujo 15 $\mu\text{L min}^{-1}$ (77%), pero esta diferencia no supone un aumento lo suficientemente significativo si se considera que los porcentajes de desviación estándar relativa que se suelen obtener en

procedimientos EME se encuentran entre el 10-15 %, por lo que se puede decir que ambos a ambos flujos se alcanzaban resultados similares.

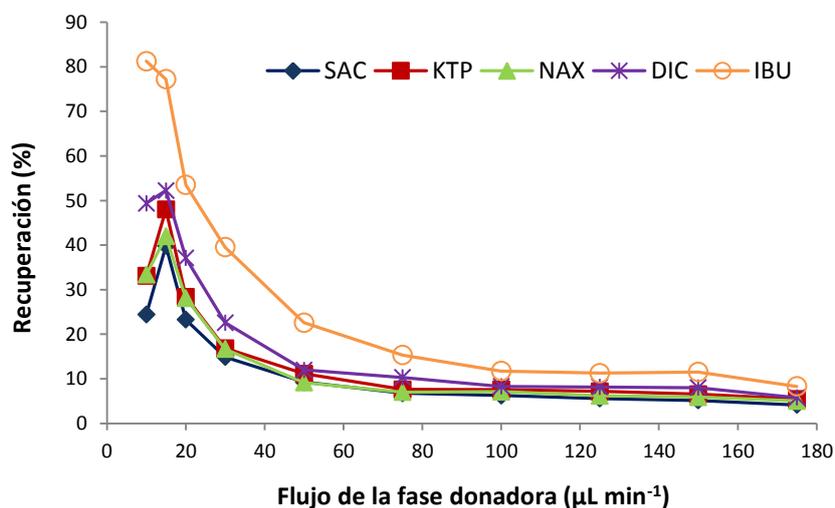


Figura 3.4. Optimización del flujo de fase donadora. %RSD < 12%.

3.1.1.5. Influencia del pH de la fase donadora y de la fase aceptora

La elección adecuada del pH de las dos fases acuosas implicadas en los procesos de EME, es un aspecto muy importante para garantizar el máximo rendimiento de extracción, ya que de él va a depender que los compuestos se encuentren en su forma iónica y, en gran medida, el grado en el que se dé el transporte de materia a través de la membrana líquida [28-30].

El pH de las fases donadora y aceptora se optimizó empleando un flujo de fase donadora de $15 \mu\text{L min}^{-1}$ y aplicando un voltaje de 10 voltios durante 10 minutos a una disolución acuosa que contenía todos los fármacos estudiados a una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En primer lugar, se evaluó la influencia del pH de la fase donadora manteniendo fijo el de la fase aceptora a un valor de 12 con NaOH 10 mM. Se realizaron diferentes ensayos en los que el pH de la fase donadora se ajustó en un rango de valores comprendidos entre 5.2 y 12 utilizando KOH, ya que éste fue el hidróxido alcalino con el que se obtuvieron los mejores resultados en el estudio descrito en la apartado 2.3.1.5. En el caso concreto de pH 5.2, este era el valor de pH, sin ajustar, de la propia disolución acuosa de los cinco compuestos en agua ultrapura a una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En la Figura 3.5 se muestran los resultados obtenidos al variar el pH de la fase donadora manteniendo constante la composición de la fase aceptora.

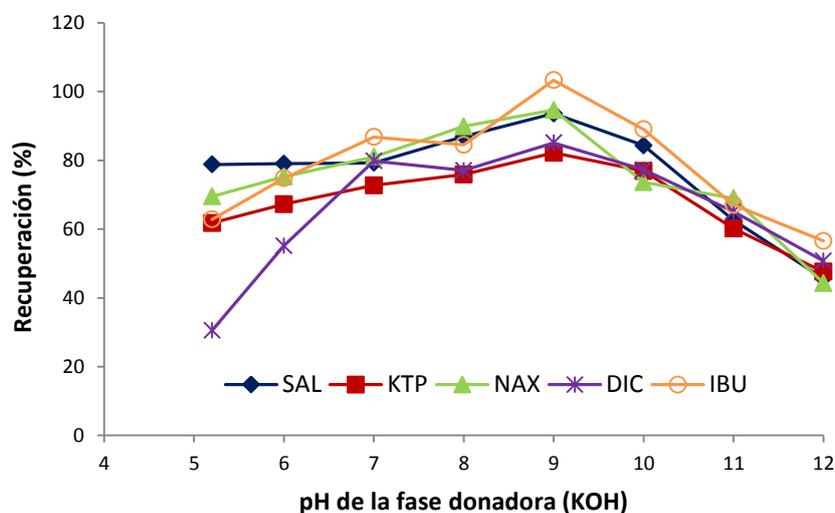


Figura 3.5. Influencia del pH de la fase donadora. %RSD < 10%.

Como puede verse, para todos los compuestos, las recuperaciones más bajas se obtuvieron a valores de pH extremos; esto es a pH 5.2 en el

extremo inferior y pH 11 y 12 en el extremo superior. Por su parte, en el intervalo de valores comprendido entre 7 y 10 las recuperaciones eran bastante similares entre sí para cada compuesto, aunque para todos ellos la eficacia de la extracción era ligeramente superior a pH 9, con valores comprendidos entre un 82% para KTP y un 102% para IBU.

Al finalizar la extracción, se comprobó el pH de cada una de las fases. Mientras que el pH de la fase aceptora permanecía constante, no ocurría lo mismo con el de la donadora cuyo pH aumentaba hasta un valor comprendido entre 10-11. No obstante, este aumento no parecía afectar a la eficacia del proceso, ya que las recuperaciones obtenidas seguían siendo mayores que las que se alcanzaban cuando el pH de la fase donadora se ajustaba a un valor de 10 o de 11 desde el inicio del proceso.

En estas condiciones de flujo, tiempo y voltaje, las intensidades de corriente promedio registradas a los distintos pHs evaluados fueron notablemente elevadas, con valores comprendidos entre 150 a pH 5.2 y 360 μA a pH 12. La tendencia observada en la intensidad de corriente parece indicar que la posterior optimización de la diferencia de potencial aplicado, podría dar lugar a corrientes mucho mayores, las cuales podrían derivar en la pérdida de estabilidad y reproducibilidad del sistema. Por lo tanto, con objeto de incrementar dicha estabilidad y evitar los cambios de pH en la fase donadora, se repitió el mismo estudio de pH pero utilizando diferentes disoluciones tampón para controlar el pH de la disolución donadora. Para fijar pH 5 y 6, se emplearon disoluciones tampón de ácido cítrico/citrato de sodio 300 mM, para pH 7 y 8 disoluciones tampón fosfato monosódico/fosfato disódico 300 mM y para pH 9, 10 y 11 disoluciones tampón amoníaco/cloruro de amonio 300 mM. El pH de la fase aceptora se

ajustó nuevamente a un valor de 12 utilizando una disolución de NaOH 10 mM.

Aunque la introducción de disoluciones tampón en la fase donadora evitó los cambios de pH de la misma una vez finalizada la extracción, en ningún caso los resultados obtenidos a los diferentes valores de pH mejoraron a los del estudio anterior. En presencia de tampones, las recuperaciones de extracción fueron más bajas y las intensidades de corriente promedio registradas resultaron ser similares o ligeramente superiores a las obtenidas al ajustar el pH de la fase donadora utilizando KOH.

Por lo tanto, se seleccionó pH 9 ajustado con KOH como valor óptimo para el pH de la fase donadora.

La influencia de la composición de la fase aceptora se analizó ajustando el pH de la misma a valores comprendidos entre 7 y 12.5, utilizando para ello disoluciones de NaOH. El pH de la fase donadora se ajustó con hidróxido de potasio (KOH) al valor óptimo anteriormente obtenido (pH 9).

La tendencia observada en la Figura 3.6 muestra que, a diferencia de lo que ocurría con el pH de la fase donadora, el pH de la fase aceptora juega un papel más crítico en la eficacia del proceso ya que ésta varía drásticamente en función del valor de pH al que se realice la extracción. De este modo, puede verse claramente que los mejores resultados se alcanzaban a un valor de pH 12 mientras que, valores tanto mayores como menores a éste proporcionaban rendimientos de extracción

considerablemente más bajos. Así, a valores inferiores a pH 8, no se extraía ninguno de los compuestos o bien lo hacían por debajo del límite de detección que proporcionan las condiciones operacionales empleadas en este estudio. A partir de pH 9, algunos compuestos como SAL y KTP comenzaban a extraerse mientras que otros como NAX o IBU no lo hacían hasta que el pH de la fase aceptora se ajustaba a un valor igual o superior a 11. Por su parte, a valores de pH por encima de 12 las recuperaciones disminuían nuevamente para todos los compuestos, lo cual podría deberse, probablemente, a la degradación de los mismos, siendo especialmente significativo el caso de SAL.

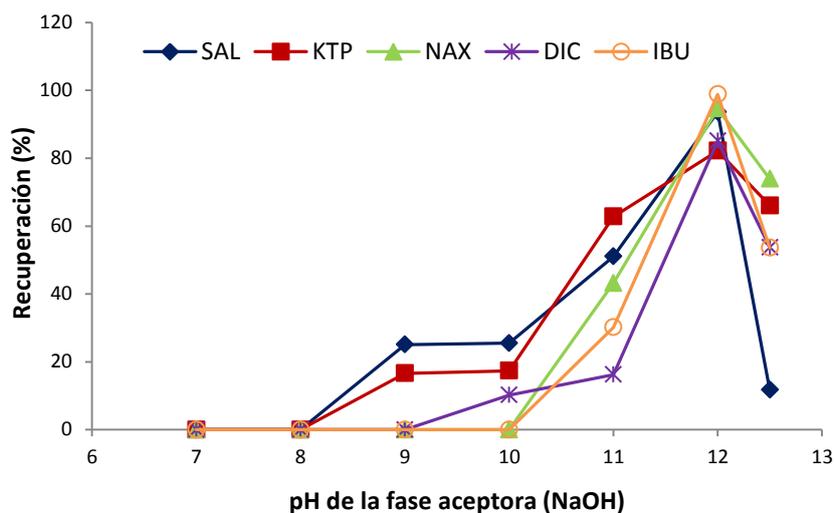


Figura 3.6. Influencia del pH de la fase aceptora. %RSD < 10%.

Una vez finalizada la extracción se comprobó el pH de cada una de las fases, observándose, que cuando el pH de la fase aceptora se ajustaba a valores comprendidos entre y 10, el pH de ambas fases permanecía constante. Este comportamiento indica que los fenómenos de electrolisis apenas estaban presentes en estas condiciones, lo cual pudo deberse,

probablemente, a las bajas intensidades de corriente promedio registradas, comprendidas entre 5 μA a pH 7 y 17 μA a pH 10. Por su parte, a valores de pH de 11, 12 y 12.5 se observó un comportamiento diferente, pues aunque el pH de la fase aceptora permanecía inalterado, el de la fase donadora aumentó hasta valores comprendidos entre 10 y 11. Este hecho puede deberse a los mayores valores de intensidad de corriente promedio registrados a estos valores de pH, situados entre 60 μA y 120 μA . Como resultado, las reacciones de electrolisis se multiplican lo que conduce a un aumento de la concentración de iones H^+ y OH^- , responsables de las variaciones de pH observadas. Este aumento en el valor del pH de la fase donadora, en principio, tiene un efecto positivo en el proceso de extracción dado que este aumento de pH favorece aún más la ionización de los analitos y, por lo tanto, la migración de los mismos hacia la fase aceptora.

Por lo tanto, y según los resultados obtenidos, se seleccionó pH 12 (NaOH 10 mM) como valor óptimo para el pH de la fase aceptora.

Del mismo modo que en el caso de la optimización del pH de la fase donadora, se evaluó el efecto sobre la extracción empleando disoluciones tampón a diferentes valores de pH de fase aceptora. Para ello, se utilizaron las mismas disoluciones tampón anteriormente mencionadas para valores de pH comprendidos entre 5 y 11 y de concentración 30 mM. Por su parte, el pH de la fase donadora se ajustó a 9 utilizando KOH.

En este caso, todos los compuestos se extraían a todos los valores de pH evaluados (5-11), con recuperaciones por encima del 60% que superaban, incluso, a las obtenidas en este mismo intervalo de pHs al utilizar NaOH en la fase aceptora (Figura 3.7). Este comportamiento puede

explicarse teniendo en cuenta que el uso de tampones en la fase aceptora, hace que la intensidad de corriente promedio generada en todos los casos (comprendidas a 175 μA a pH 5 y 45 μA para pH 10) sea algo mayor que la obtenida a esos mismos valores de pH pero en presencia de NaOH, hecho que contribuye a aumentar la movilidad iónica y, por lo tanto, la migración de los analitos hacia la fase aceptora. Aunque los resultados obtenidos a los distintos valores de pH son comparables entre sí, se aprecia que a pH 10 eran ligeramente superiores para todos los compuestos y que, además, para KTP y DIC mostraban una mejora considerable respecto de los obtenidos a pH 12 con NaOH 10 mM, con recuperaciones próximas al 100% (Tabla 3.1).

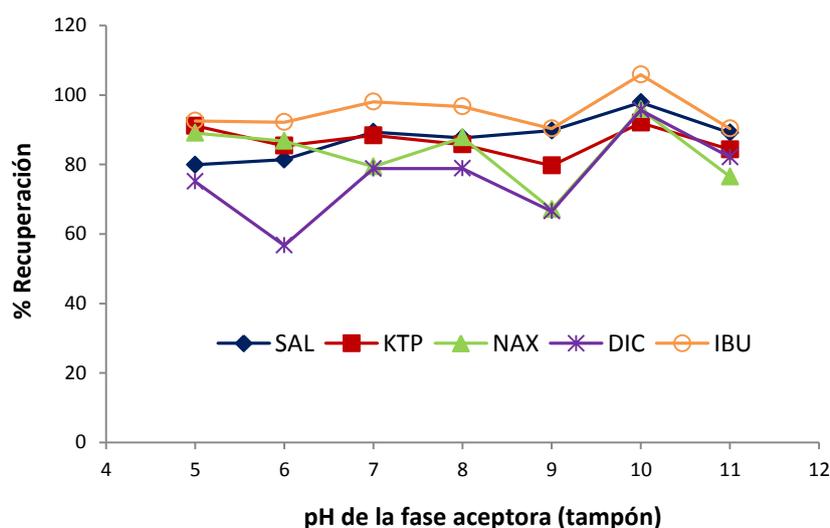


Figura 3.7. Influencia del pH de la fase aceptora en presencia de tampones. %RSD < 9%.

Por otra parte, al utilizar el tampón de pH 10 en la fase aceptora el sistema resultó ser más estable, ya que la corriente promedio se redujo aproximadamente a la mitad (45 μA) respecto de la obtenida a pH 12 con NaOH (100 μA).

Tabla 3.1. Recuperaciones obtenidas cuando el pH de la fase donadora se mantiene a pH 9 (KOH) y la fase aceptora a pH 12 (NaOH) y pH 10 (amoníaco/cloruro de amonio).

| Recuperación (%) ^a | | | | | |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| pH de la fase donadora: 9 (NaOH) | | | | | |
| pH de la fase aceptora | SAL ^b | KTP ^c | NAX ^b | DIC ^c | IBU ^b |
| 12 (NaOH) | 93.6 ± 2.3 | 81.2 ± 5.1 | 94.6 ± 1.9 | 83.1 ± 3.4 | 98.9 ± 3.7 |
| 10 (tampón) | 95.9 ± 5.8 | 92.9 ± 3.1 | 95.6 ± 6.4 | 95,7 ± 4.3 | 105.9 ± 5.3 |

^aMedia correspondiente a tres determinaciones ± desviación estándar. %RSD < 7%.

^bDetección por FLD

^cDetección por DAD

Por esta razón, se estableció pH 10 (amoníaco/cloruro de amonio) como valor óptimo para la fase aceptora.

3.1.1.6. Influencia del voltaje de extracción

Una vez establecidos el flujo de fase donadora así como los correspondientes valores de pH de cada una de las fases implicadas en el proceso, se optimizó la diferencia de potencial aplicado. La elección adecuada del voltaje de extracción, es crucial para asegurar el éxito de cualquier procedimiento de EME. Dado que voltajes mayores favorecen el flujo de analitos a través de la SLM, cabe esperar que al aumentar el voltaje también lo haga la eficacia de la extracción.

Se evaluaron un total seis valores de voltaje comprendidos entre 5 y 70 voltios para un tiempo de extracción de diez minutos y en las condiciones de flujo y pH anteriormente indicadas para las fases donadora y aceptora. Como puede verse en la Figura 3.8, para todos los compuestos, los peores resultados se alcanzaban cuando la extracción se realizaba a un

voltaje de 5 voltios, siendo las recuperaciones inferiores al 70%. Sin embargo, para el resto de voltajes estudiados los resultados fueron prácticamente los mismos, con recuperaciones próximas al 100% aunque en el caso de DIC e IBU, dichas recuperaciones disminuían notoriamente a partir de 70 voltios. Por lo tanto, se seleccionó un voltaje de 10 voltios como valor óptimo para la extracción electrocinética en este tipo de dispositivos teniendo en cuenta que, además, a este voltaje el sistema era más estable debido a que la intensidad de corriente promedio que se generaba ($45 \mu\text{A}$) era más baja que para el resto de voltajes analizados.

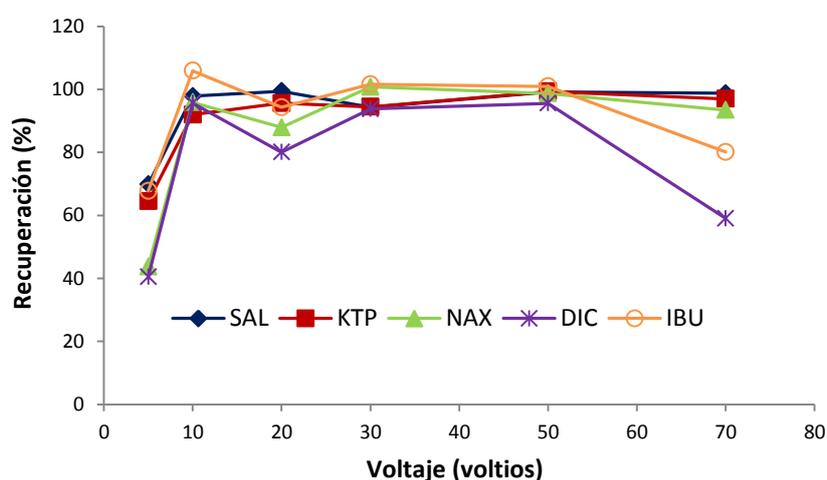


Figura 3.8. Influencia del voltaje aplicado. %RSD < 10%.

3.1.1.7. Influencia del tiempo de extracción

Por último, se optimizó el tiempo de extracción. Para ello, se llevaron a cabo extracciones durante 10, 15, 20 y 30 minutos empleando, en todos los casos, las condiciones óptimas de extracción para el resto de parámetros operacionales. No se evaluaron tiempos inferiores a 10 minutos dado que, según el flujo de fase donadora empleado ($15 \mu\text{L min}^{-1}$),

se obtendrían factores de enriquecimiento inferiores a la unidad, dando como resultado la dilución de la muestra.

Tal y como se refleja en la Figura 3.9, a tiempos de operación superiores a 10 minutos, la eficacia de la extracción disminuía progresivamente para todos los AINEs a medida que aumentaba la duración del proceso. Mientras que al pasar de 10 a 15 minutos las recuperaciones disminuían apenas entre un 7 y un 17%, a partir de los 20 minutos se reducen en más de un 50% respecto de las que se obtenían a 10 minutos. Esta tendencia se debe, fundamentalmente, a la progresiva pérdida que se produce de la membrana líquida a tiempos de extracción prolongados, la cual va siendo arrastrada paulatinamente por el movimiento de la fase donadora. Como resultado, el sistema trifásico formado por las dos fases acuosas separadas por el disolvente orgánico se pierde y, por lo tanto, la estabilidad del sistema se reduce, lo que conduce a una disminución en la eficacia de la extracción.

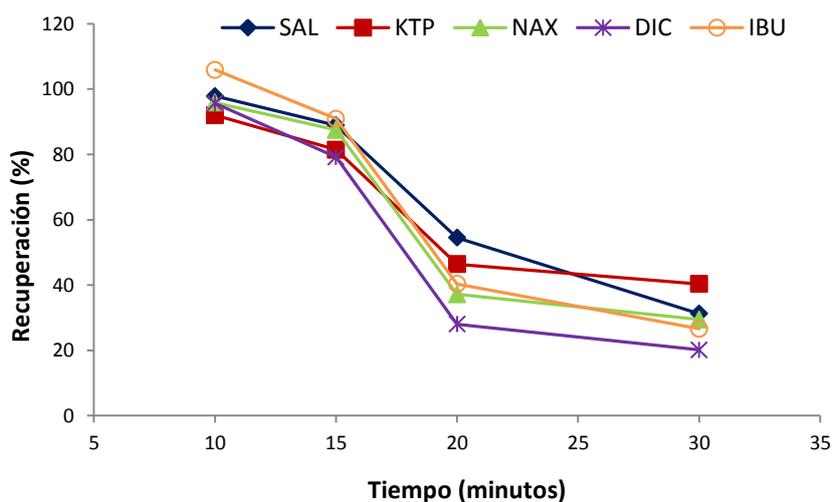


Figura 3.9. Influencia del tiempo de extracción. %RSD < 12%.

Así pues, la duración del proceso de extracción se fijó a un tiempo correspondiente a 10 minutos.

Una vez optimizadas todas las variables experimentales, y de acuerdo con los resultados obtenidos, las condiciones óptimas para llevar a cabo el procedimiento de EME utilizando el dispositivo microfluídico descrito consisten en aplicar una diferencia de potencial de 10 voltios durante 10 minutos a una disolución donadora de concentración $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de todos los AINEs estudiados y de pH 9 (KOH) que se hace pasar a través del sistema a un flujo de $15 \mu\text{L min}^{-1}$. Los compuestos se extrajeron a un volumen fijo de $150 \mu\text{L}$ de fase aceptora formada por una disolución tampón amoníaco/cloruro de amonio 30 mM de pH 10 y utilizando 1-octanol como membrana líquida soportada. Como resultado, se obtuvieron recuperaciones del 96% para SAL, 92% para KTP, 96% para NAX, 96% para DIC y 105% para IBU, con un %RSD < 8%.

La siguiente figura (Figura 3.10 (a).), representa la tendencia de la intensidad de corriente registrada en las condiciones óptimas de operación. El pico de corriente que se aprecia en los instantes iniciales del proceso, corresponde a la formación de la doble capa eléctrica alrededor de la SLM y que es crucial para que pueda darse el transporte de materia. El comportamiento posterior de la curva depende del flujo de los analitos a través de la membrana líquida y de las propias características y condiciones de operación del sistema. En este caso, puede verse como la intensidad de corriente es muy estable y que, una vez superado el pico de intensidad máxima que se alcanza en los instantes iniciales, permanece prácticamente constante durante la mayor parte del tiempo que dura la extracción, con un valor promedio inferior a $50 \mu\text{A}$ en todo momento (aproximadamente

45 μA). Dicha estabilidad se debe, principalmente, a la presencia de la disolución tampón en la fase aceptora, pues cuando ésta se sustituye por NaOH 10 mM (pH 12) sin modificar las restantes condiciones operacionales, la intensidad de corriente presenta un mayor valor promedio (100 μA) así como una tendencia variable y completamente diferente tal y como se observa en la Figura 3.10 (b).

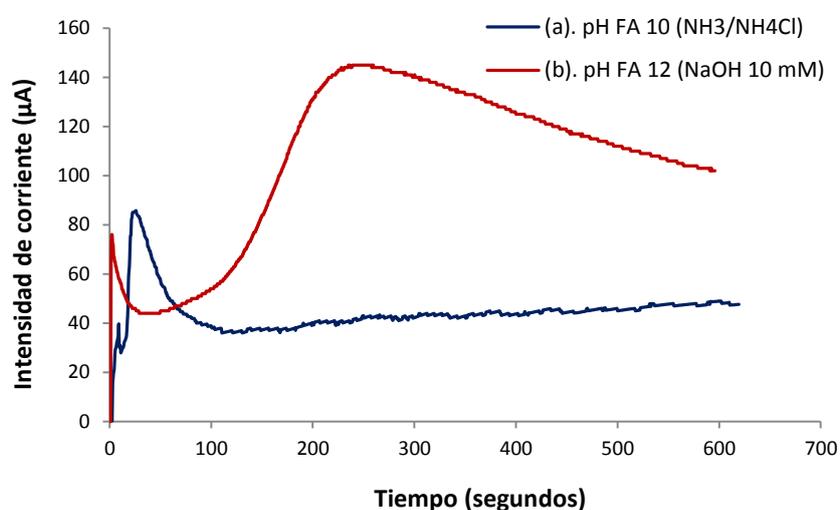


Figura 3.10. Tendencia de la intensidad de corriente (a). en las condiciones operacionales óptimas y (b). para un valor de pH 12 (NaOH 10 mM), en la fase aceptora manteniendo los restantes parámetros en sus valores óptimos.

Por otra parte, con este dispositivo apenas se observó variabilidad de la intensidad de corriente promedio de una extracción, a otra a diferencia de lo que ocurría en el sistema HF-EME. Por lo tanto, para entender cómo puede variar la eficacia de la extracción según que la intensidad de corriente promedio sea mayor o menor, habría que extender el razonamiento al resto de voltajes evaluados. Como ya se comentó al analizar la influencia del voltaje de extracción, entre 10 y 50 voltios las

recuperaciones eran prácticamente las mismas para todos los compuestos mientras que a voltajes inferiores a 10 voltios o superiores 50 voltios, las recuperaciones tendían a disminuir. Por lo tanto, puede decirse que entre 45 y 120 μA (intensidad de corriente promedio registrada a 50 voltios), las recuperaciones no varían y que por debajo o por encima de dichos valores, respectivamente, los resultados empeoran.

3.1.2. Extracción mediante electromembrana utilizando un dispositivo con una configuración para el uso de soportes planos (FM-EME)

En la segunda parte, se describe la optimización de un procedimiento de extracción mediante electromembrana en el que se utiliza un dispositivo diseñado para el uso de soportes planos para inmovilizar la membrana líquida (FM-EME). Se trata de un sistema que opera en condiciones estáticas, pues las fases donadora y aceptora permanecen inmóviles durante todo el proceso. Por lo tanto, desde el punto de vista operacional puede considerarse que este dispositivo combina algunas de las características de los dos anteriormente descritos, pues, por un lado, al igual que ocurría en el sistema que emplea fibras huecas (HF-EME), el volumen de las fases donadora y aceptora permanece fijo en todo momento y, por otro, utiliza soportes planos para la SLM al igual que el dispositivo microfluídico ($\mu\text{F-EME}$).

El dispositivo experimental empleado para optimizar el correspondiente procedimiento de extracción mediante electromembrana se representa en la Figura 3.11.

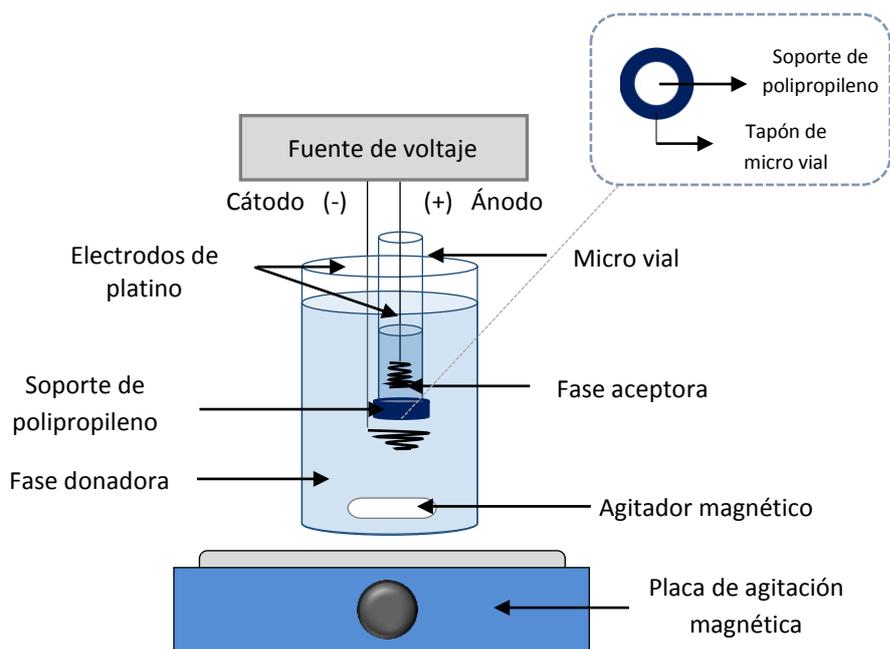


Figura 3.11. Dispositivo experimental empleado en el procedimiento de EME con soportes planos para la SLM.

El compartimento para la fase aceptora está formado por un micro vial de inyección de 2 mL con tapón roscado (2 mL 2-SV, Chromacol, Welwyn Garden City, Reino Unido) cuya base se cortó para poder colocar, por ese extremo, la fase aceptora y el electrodo correspondiente.

Para inmovilizar la membrana líquida, se emplearon soportes de polipropileno de 25 μm de espesor, un 55% de porosidad y un tamaño de poro de 0.21 μm x 0.05 μm . Dichos soportes, se cortaron en pequeñas piezas de 10 x 10 mm y se colocaron en el interior del tapón del micro vial. A continuación, el tapón se enroscó empleando una arandela de goma para sellar el vial, de forma que quedase hermético y no se produjesen fugas de la fase aceptora hacia la fase donadora. Seguidamente, el tapón del micro vial se sumergió en la membrana líquida (1-octanol) durante 5 segundos, para impregnar el soporte de polipropileno con el disolvente. El exceso de

éste, se eliminó utilizando un papel humedecido en agua. Posteriormente, se introdujeron, por el extremo abierto, 250 μL de la fase aceptora así como el correspondiente electrodo de platino. A su vez, todo este conjunto se colocó en el interior de un vial de 25 mL que contenía 10 mL de fase donadora y el segundo electrodo de platino. En este caso, se utilizaron como electrodos dos hilos de platino de 0.25 mm de diámetro (99.9% (metal basis) \approx 1.05 g/m, Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania) cuyos extremos terminaban en forma de espiral, tal y como se observa en la Figura 3.11.

Finalmente, los electrodos se conectaron a la fuente de voltaje y se aplicó la diferencia de potencial adecuada para llevar a cabo el proceso. Finalizado el tiempo de extracción, se desconectó la fuente y, con la ayuda de una microjeringa, se recogieron 20 μL de fase aceptora que se inyectaron directamente en el sistema cromatográfico para su análisis. Las condiciones de separación y determinación cromatográficas empleadas fueron las mismas que se describen en el apartado 2.1 de esta Memoria.

Durante todo el procedimiento, la fase donadora se mantuvo en constante agitación a una velocidad de 400 rpm utilizando un agitador magnético. Por su parte, la intensidad de corriente generada se registró (un dato cada 0.5 segundos) conectando en serie un multímetro digital que, se conecta a un ordenador.

Después de cada extracción el soporte de polipropileno se desechó y se reemplazó por uno nuevo, evitando así fenómenos de contaminación cruzada (*carry over*). Así mismo, los micro viales utilizados para albergar la fase aceptora se pueden limpiar y reutilizar tantas veces como sea necesario.

3.1.2.1. Optimización de los parámetros operacionales que influyen en el procedimiento de extracción

Los primeros estudios se realizaron según el procedimiento de extracción anteriormente descrito aplicando un voltaje de 10 voltios durante 10 minutos a 10 mL de una disolución donadora que contenía todos los analitos de interés a una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y que se agitó a una velocidad constante de 400 rpm. Los compuestos se extrajeron a un volumen de fase aceptora de 250 μL . El pH de ambas fases se estableció, inicialmente, en un valor de 12 utilizando en cada caso el hidróxido alcalino que más contribuye a la migración electrocinética de los compuestos analizados. De este modo, el pH de la fase donadora se ajustó con KOH 10 mM y el de la aceptora con NaOH 10 mM. Partiendo de estas condiciones experimentales, se optimizaron el pH y el volumen de las fases donadora y aceptora, el voltaje aplicado y la duración de la extracción.

Por otra parte, y según el razonamiento expuesto en la apartado 3.1.1.2, se utilizará, una vez más, 1-octanol como membrana líquida durante todo el análisis.

3.1.2.2. Influencia del pH de la fase donadora y de la fase aceptora

En primer lugar, se evaluó la influencia del pH de la fase donadora manteniendo fijo el de la fase aceptora a un valor de 12 con NaOH 10 mM. Para ello, se ajustó el pH de la misma a valores comprendidos entre 5.2 y 12 utilizando KOH. En el caso de pH 5.2, este valor es el que presenta el pH de la propia disolución donadora en presencia de los AINEs seleccionados a una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ en agua ultrapura y sin ajustar. Teniendo en cuenta que el compuesto que presenta el mayor pKa es el naproxeno,

con un valor de 4.84, puede decirse que en el intervalo de valores de pH estudiados para la fase donadora todos los analitos se encontraban completamente ionizados.

Según los datos que se recogen en la Figura 3.12, puede verse como en el intervalo de pHs que va de 5 a 10, las recuperaciones para cada uno de los compuestos eran prácticamente las mismas salvo ligeras variaciones observadas para SAL y NAX, mientras que a pH 11 y 12 disminuían progresivamente. Respecto al comportamiento del pH de cada una de las fases acuosas una vez finalizada la extracción, se observó que el pH de la fase aceptora no variaba, independientemente de cuál fuera el valor del pH de la fase donadora, mientras que el de ésta, excepto cuando se ajustaba a 12, aumentaba hasta valores comprendidos entre 9.5 y 11 al finalizar el proceso. En principio, este comportamiento podría tener un efecto positivo en la extracción pues debido a los valores de pKa de los compuestos, cuanto mayor es el pH más favorecida está su ionización y, por lo tanto su migración hacia la fase aceptora.

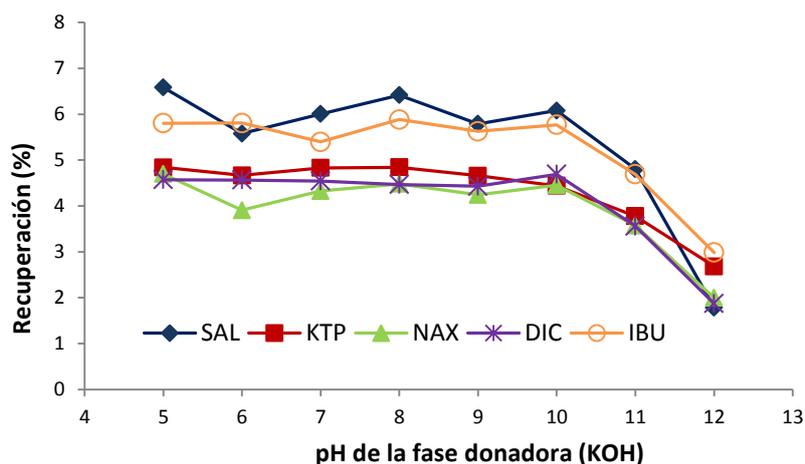


Figura 3.12. Influencia del pH de la fase donadora empleando KOH (pH de la fase aceptora 12, NaOH 10 mM). %RSD < 11%.

No obstante, al igual que se hizo con el dispositivo microfluídico, para comprobar si la eficacia de la extracción se veía afectada negativamente por este cambio de pH en la fase donadora, se repitió el mismo estudio pero utilizando disoluciones tampón para ajustar el pH de la misma. De este modo, se consigue que el pH de la disolución donadora permanezca constante y no varíe al finalizar la extracción. En ese sentido, se evaluó la influencia del pH de la fase donadora en el mismo intervalo de valores (5.2-12) utilizando para ello las mismas disoluciones tampón descritas en el apartado 3.2.1.5 modificando su concentración de 300 a 100 mM. Esto último fue necesario dado que la corriente que se generaba a una concentración de 300 mM era tan elevada que se perdía la estabilidad del sistema y los compuestos prácticamente no se extraían. El pH de la fase aceptora se mantuvo a un valor de 12 utilizando una disolución de NaOH 10 mM.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.13. Lo primero que se observa es que a pH 9 y 10 los compuestos no se extraían. Esto se debe a que la corriente promedio generada con estas disoluciones tampón era tan alta (por encima de 3 mA) que inmediatamente se formaban burbujas en ambas fases y se perdía la estabilidad del sistema. Como consecuencia, el pH de ninguna de las fases se mantuvo constante debido al exceso de iones OH^- y H^+ generados en las reacciones que se producen durante la electrolisis del agua. Por su parte, para los valores de pH 5, 6, 7 y 8, el comportamiento del sistema era bastante similar pues aunque el pH de la fase donadora se mantenía constante, no ocurría lo mismo con el de la fase aceptora, que disminuía drásticamente hasta valores de pH comprendidos entre 3 y 4. Este cambio en el pH de la fase aceptora hasta valores ácidos provoca que algunos de los analitos presentes en la fase

aceptora pierdan su carga y se neutralicen y, como resultado vuelven por retrodifusión hacia la fase donadora, lo que hace disminuir la eficacia de la extracción [28]. Para este estudio, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar la disolución tampón de pH 11 pues, en presencia de ésta, se mantuvo la estabilidad del sistema, no observándose la formación de burbujas ni cambios en el pH de ninguna de las fases acuosas implicadas en el proceso. Además, a este valor de pH la intensidad de corriente era más baja que la registrada con el resto de disoluciones tampón, lo que explicaría la mayor estabilidad del sistema y, por tanto, por qué el pH de ambas fases se mantuvo constante. No obstante, aunque el sistema se mantenía estable, las recuperaciones alcanzadas con esta disolución tampón, comprendidas entre el 2.7% para NAX y el 3.5% para IBU, en ningún caso mejoraban a las que se alcanzaban al propio pH de la disolución donadora.

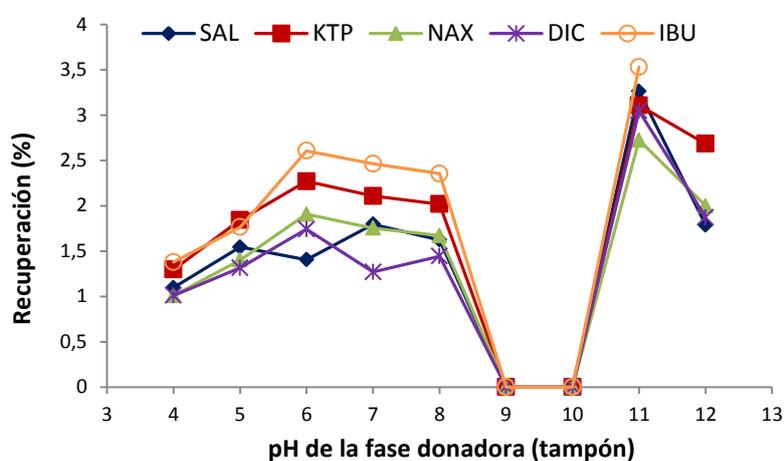


Figura 3.13. Influencia del pH de la fase donadora empleando disoluciones tampón (pH de la fase aceptora 12, NaOH 10 mM). %RSD < 10%.

Así pues, en estas condiciones experimentales, los rendimientos fueron mejores para aquellas extracciones en las que no se controlaba el

pH de la fase donadora, obteniéndose recuperaciones comprendidas entre el 4.6% para IBU y 6.6% para SAL. Por lo tanto, se seleccionó el pH de la propia disolución donadora (pH 5.2) como valor óptimo para llevar a cabo la optimización del resto de parámetros operacionales.

Una vez seleccionado el pH de la fase donadora, se estudió el de la fase aceptora para valores comprendidos entre 6 y 12.5. En el caso concreto de pH 6, éste correspondía al del agua ultrapura como fase aceptora, mientras que el resto de valores se fijaron utilizando NaOH. Al igual que ocurría en los sistemas previamente evaluados, la eficacia de la extracción depende en gran medida del pH de la fase aceptora. Como se muestra en la Figura 3.14, una vez más los mejores rendimientos de extracción se obtenían claramente para un valor de pH 12. Por su parte, en las proximidades de pH 12, a pH 11 y 12.5 los resultados disminuían considerablemente mientras que a pHs inferiores a 11, comprendidos entre 6 y 10, las recuperaciones fueron bastante pobres para todos los compuestos, con valores que oscilan entre el 0.5-1.9%.

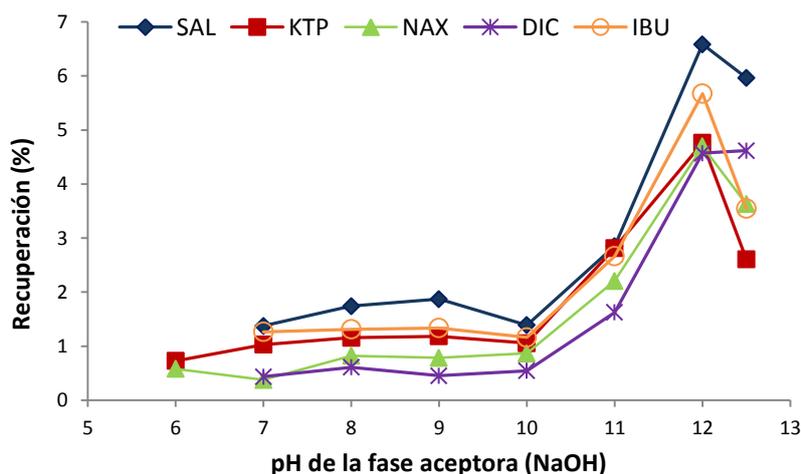


Figura 3.14. Influencia del pH de la fase aceptora empleando NaOH (pH de la fase donadora 5, sin ajustar). %RSD < 10%.

Al finalizar la extracción, se comprobó el pH de ambas fases, observándose que el pH de las mismas permanecía inalterado cuando el pH de la fase aceptora se ajustaba a valores comprendidos entre 6 y 11. Sin embargo, aunque el pH de la fase aceptora permanecía constante para valores de 12 ó 12.5 no ocurría lo mismo con la fase donadora cuyo pH subía hasta valores comprendidos entre 10 y 11.

Como ya se hizo en el dispositivo microfluídico (μ F-EME), y a fin de completar el estudio de pH, se comprobó también cómo afectaba a la extracción el uso de disoluciones tampón para ajustar el pH de la fase aceptora. Para ello se evaluó el mismo intervalo de valores de pH utilizando las mismas disoluciones tampón descritas en el estudio pH de la fase donadora pero de concentración 30 mM. Por su parte, el pH de la fase donadora se mantuvo al pH de la propia disolución conteniendo los compuestos de interés.

De acuerdo con la tendencia que se observa en la Figura 3.15, a medida que se incrementaba el pH de la fase aceptora, las recuperaciones aumentaban progresivamente para todos los compuestos, alcanzando el máximo valor a pH 11. Además, la intensidad de corriente promedio registrada a este pH, fue la misma que se registró a pH 12 con NaOH. No obstante, en presencia del tampón amonio (pH 11), las recuperaciones fueron entre un 20 y un 54% más bajas, por lo que se seleccionó pH 12 ajustado con NaOH 10 mM como valor óptimo para el pH de la fase aceptora para el resto del estudio.

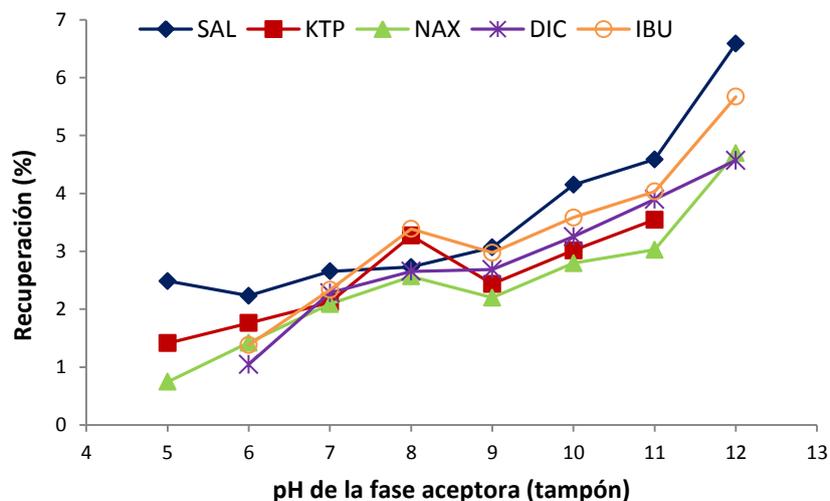


Figura 3.15. Influencia del pH de la fase aceptora empleando tampones (pH de la fase donadora 5.2 (sin ajustar)). %RSD < 9%.

3.1.2.3. Influencia del voltaje y del tiempo de extracción

En primer lugar se analizó el voltaje aplicado en un rango comprendido entre 10 y 80 voltios durante 10 minutos. El pH de la fase donadora se mantuvo al de la propia disolución mientras que el de la fase aceptora se fijó en 12 con NaOH 10 mM. Como puede verse en la Figura 3.16, las recuperaciones aumentaban considerablemente para todos los compuestos con el incremento de voltaje hasta un valor máximo de 80 voltios. La tendencia observada parece indicar que el rendimiento de la extracción podría aumentar si se empleasen voltajes superiores a 80 voltios. No obstante, por encima de este valor la intensidad de corriente alcanzaba valores promedios superiores a los 400 μ A y, como resultado, se observó la formación de gran cantidad de burbujas en ambas fases que provocaban cambios bruscos en el pH de las mismas. Así mismo, se produjo una considerable disminución en el volumen de la fase aceptora

(aproximadamente un 20% del total empleado). Por lo tanto, se seleccionó un voltaje de 80 voltios como valor óptimo para llevar a cabo la extracción, obteniéndose recuperaciones comprendidas entre el 20-29%.

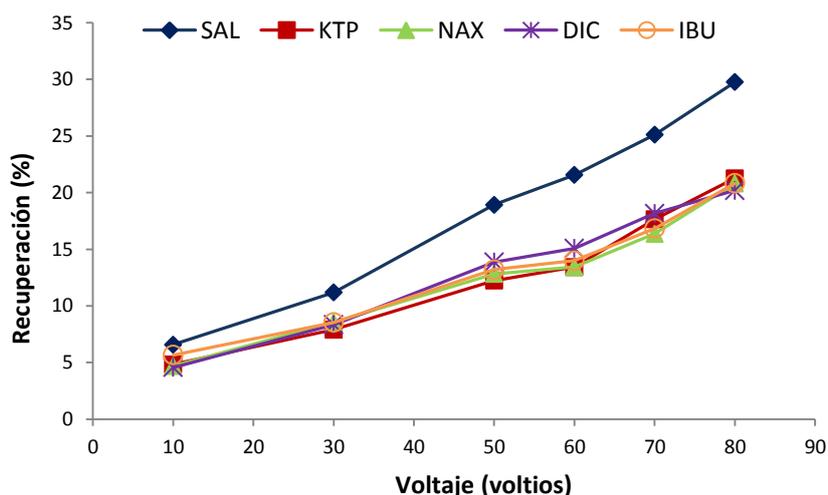


Figura 3.16. Influencia del voltaje aplicado. %RSD < 8%.

A continuación, se optimizó el tiempo de extracción para valores de 3, 5, 7, 10 y 12 minutos utilizando, en todos los casos, las condiciones de pH y voltaje anteriormente establecidas. Las recuperaciones obtenidas a los distintos tiempos de extracción evaluados se muestran en la Figura 3.17. Al igual que ocurría con el voltaje, las recuperaciones para cada uno de los analitos a los distintos tiempos de extracción, aumentaban progresivamente hasta los 12 minutos. A tiempos superiores a éste, se producía un descenso importante en el volumen de la fase aceptora que impedía emplear mayores tiempos de extracción. Este comportamiento puede tener su origen en la progresiva pérdida de la membrana líquida que se produce como resultado de la dispersión de la misma en la fase

donadora a causa de la agitación constante de ésta última. Así pues, la duración de la extracción se estableció a un tiempo de 12 minutos, con recuperaciones comprendidas ente el 22-34% y que mejoran ligeramente a las obtenidas a 10 minutos.

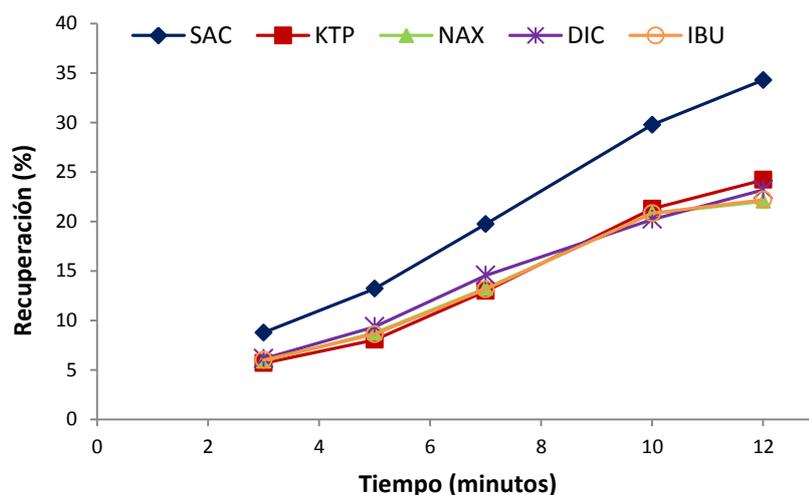


Figura 3.17. Influencia del tiempo de extracción. % < RSD 10.8 %.

3.1.2.4. Influencia del volumen de las fases donadora y aceptora

Por último, se optimizó el volumen de las fases donadora y aceptora para comprobar cómo influye esta variable en la eficacia del proceso. Para ello se tuvieron en cuenta, además de las de recuperaciones de extracción, los factores de enriquecimiento dado que este parámetro está directamente relacionado con la relación de volúmenes entre ambas fases, lo cual es de suma importancia a la hora de evaluar la sensibilidad del método.

En primer lugar, se analizaron diferentes volúmenes de fase donadora comprendidos entre 5-100 mL (5, 10, 20, 25, 50 y 100 mL), manteniendo el volumen de la fase aceptora fijo en 250 μL . En todos los casos, la concentración de la fase donadora fue de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todos los compuestos analizados. Volúmenes inferiores a 5 mL no pudieron ser evaluados debido a que las propias dimensiones y geometría del sistema impedían la agitación de volúmenes tan reducidos de fase donadora.

Teniendo en cuenta que a medida que aumenta el volumen de fase donadora también lo hace la relación entre los volúmenes de ambas fases, cabría esperar que los factores de enriquecimiento obtenidos fuesen sucesivamente mayores. Sin embargo, aunque los factores de enriquecimiento aumentaban al pasar de 5 mL a 10 mL de fase donadora, para volúmenes mayores se mantenían prácticamente constantes para todos los compuestos. Este comportamiento podría explicarse considerando que, para una misma concentración de analito, cuanto mayor es el volumen de la fase donadora también lo es la cantidad de analito disponible en el medio, lo cual podría dar lugar a la saturación de la SLM e impedir o limitar la migración de los compuestos hacia la fase aceptora. Así pues, teniendo en cuenta los factores de enriquecimiento, el volumen óptimo de fase donadora sería 10 mL. Por otra parte, la tendencia observada en la Figura 3.18, indica que el porcentaje de recuperación disminuía, paulatinamente, para todos los compuestos a medida que aumentaba el volumen de fase donadora, de forma que los mejores resultados se obtuvieron al emplear 5 mL de fase donadora.

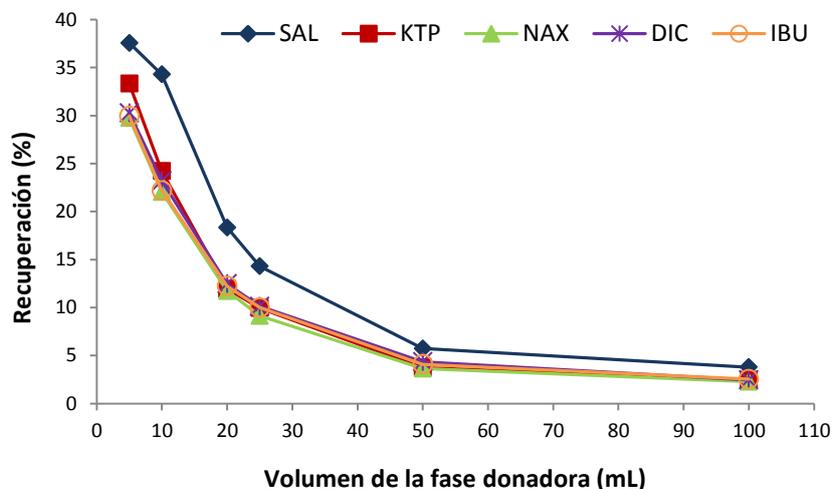


Figura 3.18. Influencia del volumen de la fase donadora. %RSD < 9%.

Por lo tanto, el volumen óptimo de fase donadora difiere según que los resultados se consideren exclusivamente en términos de factores de enriquecimiento o de porcentajes de recuperación. Por esta razón, la elección del volumen óptimo de fase donadora se realizó de forma que se obtuviera un compromiso entre ambos resultados, por lo que 20, 25, 50 y 100 mL fueron descartados y se analizaron los resultados obtenidos con 5 y 10 mL. Así, las recuperaciones obtenidas con 10 mL fueron entre un 8-25 % más bajas que las obtenidas con 5 mL, sin embargo, se obtuvieron factores de enriquecimiento entre un 30-40 % más altos que con 5 mL de fase donadora. De este modo, se seleccionó 10 mL como volumen óptimo para la fase donadora, al observarse mejores resultados en términos de sensibilidad del método.

Finalmente, se estudió cómo influye el volumen de la fase aceptora en el rendimiento del proceso analizando un total de cuatro volúmenes: 250 μ L, 300 μ L, 350 μ L y 400 μ L. Debido a las características y el tamaño del

propio compartimento de la fase aceptora, no podían emplearse volúmenes inferiores a 250 μL . Al igual que se hizo para el volumen de fase donadora, los resultados se analizaron en términos de recuperaciones y factores de enriquecimiento. Mientras que las recuperaciones de extracción son prácticamente las mismas para todos los volúmenes ensayados, los factores de enriquecimiento disminuyen progresivamente a medida que aumenta el volumen de fase aceptora. Por lo tanto, y teniendo en cuenta el compromiso que ha de haber entre ambos parámetros, se seleccionó 250 μL como volumen óptimo para la fase aceptora dado que es el que proporciona los mejores resultados en lo que a eficacia de extracción se refiere.

Una vez optimizados los distintos parámetros operacionales que influyen en el procedimiento de EME para el dispositivo FM-EME, se concluyó que los mejores resultados se obtenían al aplicar una diferencia de potencial de 80 voltios durante 12 minutos a 10 mL de una disolución donadora de concentración $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todos los analitos seleccionados que se agitó continuamente a una velocidad de 400 rpm y cuyo pH se mantuvo al de la propia disolución (pH 5.2). Los compuestos se extrajeron en 250 μL de fase aceptora (pH 12, NaOH 10 mM) utilizando 1-octanol como membrana líquida soportada. Las recuperaciones obtenidas para cada uno de los cinco antiinflamatorios no esteroideos estudiados fueron: 34% para SAL, 24% para KTP, 22% para NAX, 23% para DIC y 23% para IBU, lo que supone factores de enriquecimiento comprendidos entre 9 para NAX y 14 para SAL.

En estas condiciones experimentales, la intensidad de corriente registrada durante el tiempo de extracción sigue una tendencia como la

que se representa en la Figura 3.19, con un valor promedio de 300 μA . En este caso, se observa como la intensidad de corriente permanece prácticamente constante durante los primeros seis minutos de extracción, momento a partir del cual comienza a aumentar progresivamente hasta el final del proceso. Este comportamiento en el tramo final de la extracción puede deberse, además de a la migración de los analitos a través de la SLM, al cambio que se produce en el pH de la fase donadora. De este modo, el instante en el que la intensidad de corriente comienza a subir coincidiría con el momento en el que se producen los cambios de pH en la fase donadora, lo que conduciría a un aumento de la intensidad debido a la mayor cantidad de iones OH^- presentes en el medio como resultado de las reacciones de electrolisis. Como ya ocurriera en los otros dos sistemas evaluados, el pico inicial de corriente que se observa en el gráfico pone de manifiesto que ha tenido lugar la formación de la doble capa eléctrica que posibilita el posterior transporte de los compuestos hacia la fase aceptora.

Respecto de la variación de la eficacia del proceso en relación con la intensidad de corriente generada, cabe destacar que con este dispositivo se observó una relación directa entre ambas magnitudes. Es decir, la eficacia de la extracción aumentaba a medida que lo hacía la intensidad de corriente, siempre y cuando al finalizar la extracción dicha intensidad no fuese superior a 1.2 mA, lo que implica que el valor promedio registrado no debía superar los 400 μA , valor a partir del cual se perdía la estabilidad del sistema.

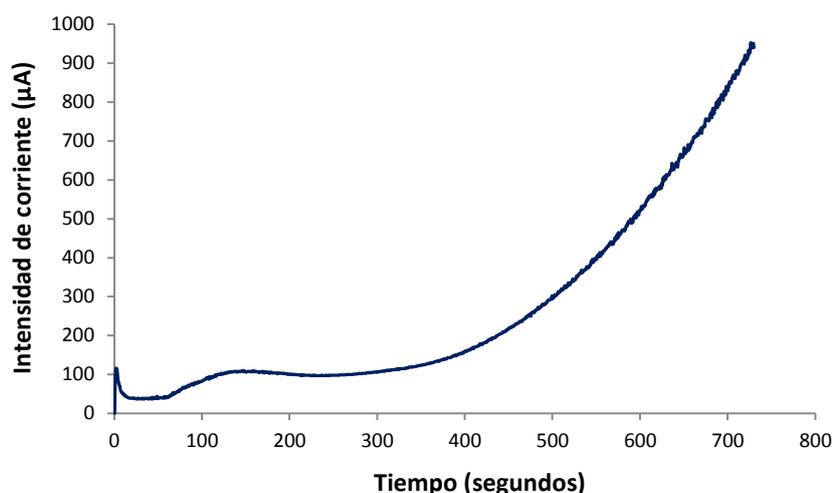


Figura 3.19. Tendencia de la intensidad de corriente registrada durante la EME con el dispositivo FM-EME en las condiciones óptimas de operación.

3.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En la tercera y última parte del capítulo, se llevará a cabo la discusión de los resultados obtenidos con cada uno de los sistemas de extracción estudiados a fin de determinar cuáles son las ventajas e inconvenientes que ofrece cada uno de ellos y evaluar en qué condiciones puede resultar más propicio el empleo de uno u otro en función del tipo de muestra que se desee analizar.

En la Tabla 3.2, se resumen los resultados obtenidos con cada uno de los sistemas de extracción evaluados. En ella se recogen los valores correspondientes a: las variables operacionales optimizadas con cada dispositivo, la eficacia del procedimiento de extracción en términos de factores de enriquecimiento y de porcentajes de recuperación así como los resultados que se obtienen tras la aplicación de cada uno de los métodos de extracción al análisis de muestras reales de orina.

En primer lugar, cabe destacar que cada dispositivo opera bajo unas condiciones operacionales óptimas que son significativamente diferentes entre sí, lo que pone de manifiesto la importancia de la geometría y la configuración del sistema empleado sobre el rendimiento de extracción. De este modo, cada uno de ellos precisa de un valor de pH diferente para la fase donadora. Mientras que HF-EME y μ F-EME requieren de un valor concreto de pH para lograr los mejores resultados, en el caso de FM-EME el procedimiento se puede llevar a cabo al propio pH de la disolución donadora, sin necesidad de ajustar el pH de la misma a un valor específico, lo cual supone una cierta ventaja en la preparación de la muestra inicial así como la menor posibilidad de que los compuestos sufran procesos de degradación. En cuanto al pH de la fase aceptora, en los tres casos se emplean valores de pH muy básicos. Además, es el único parámetro en el que los resultados presentan cierta similitud, pues dos de los sistemas evaluados, HF-EME y FM-EME comparten el mismo valor de pH para la fase aceptora: 12 ajustado con NaOH 10 mM, mientras que el tercer sistema, μ F-EME, emplea un pH valor de pH 10 ajustado con una disolución tampón $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ 30 mM.

Respecto al voltaje y al tiempo, que son los parámetros que más influyen en la eficacia del procedimiento de EME, el dispositivo microfluídico (μ F-EME), es el que implica el uso de menores voltajes y tiempos de extracción. Además, el hecho de que emplee un voltaje de tan sólo 10 voltios, lo convierte en un posible candidato para el desarrollo futuro de dispositivos portátiles que podrían operar mediante el uso de una pila común. En comparación con μ F-EME, el dispositivo FM-EME requiere un tiempo de extracción apenas dos minutos superior, aunque precisa de un voltaje ocho veces más elevado. Por su parte, el dispositivo

HF-EME emplea un voltaje y un tiempo de extracción que son, respectivamente, seis y dos veces mayores en relación con los necesarios para el funcionamiento del dispositivo microfluídico. Como resultado, se obtuvo que la intensidad de corriente promedio aumentaba en el orden: $\mu\text{F-EME} < \text{HF-EME} < \text{FM-EME}$, el cual se corresponde con los voltajes aplicados en cada caso.

En cuanto al volumen de las fases donadora y aceptora, puede decirse que también existe disparidad entre cada uno de los sistemas para los valores de dichos parámetros. Al comparar los volúmenes de fase donadora cabe destacar que, mientras que $\mu\text{F-EME}$ requiere volúmenes del orden de los microlitros, los otros dos sistemas precisan volúmenes mayores, siendo HF-EME el que emplea el volumen de fase donadora más elevado. No obstante, al considerar el volumen de la fase aceptora, se observa que, de los tres dispositivos, HF-EME es el que utiliza el volumen más bajo debido, precisamente, al reducido volumen interno de las fibras que usa como soporte para la SLM. Como consecuencia, este sistema es el que ofrece la mayor relación de volúmenes entre ambas fases y como tal, es el que permite alcanzar un mayor nivel de preconcentración de las muestras. Por su parte, el dispositivo FM-EME también permite la preconcentración de los analitos, aunque a un nivel más bajo que HF-EME. Esto último se debe a que emplea menores volúmenes para la fase donadora y mayores para la fase aceptora, de forma que la relación de volúmenes entre ambas fases es considerablemente inferior (unas 12 veces) a la que presenta HF-EME. Por el contrario, con $\mu\text{F-EME}$ la preconcentración de las muestras no es posible debido a que utiliza el mismo volumen de fase donadora y de fase aceptora.

Así mismo, se analizan y comparan los resultados obtenidos con cada sistema en sus correspondientes condiciones operacionales óptimas. De acuerdo con las razones anteriormente expuestas, el sistema HF-EME es el que proporciona los mejores resultados en términos de factores de enriquecimiento, seguido de FM-EME y μ F-EME. En términos de porcentaje de recuperación, los mejores resultados se obtienen con el dispositivo microfluídico, con recuperaciones prácticamente del 100% para todos los compuestos estudiados. Esto último es indicativo de que, con este sistema, la extracción es exhaustiva, o lo que es lo mismo, se extrae la totalidad del contenido en cada compuesto presente en la fase donadora aunque no permite la preconcentración de los mismos. Por su parte, los sistemas HF-EME y FM-EME ofrecen resultados bastante similares para la mayor parte de los compuestos estudiados en lo que a porcentaje de recuperación se refiere, pese a la considerable diferencia en sus factores de enriquecimiento debida a las diferentes relaciones de volúmenes en las fases donadora y aceptora que la configuración de estos sistemas permite. Así pues, aunque en términos de recuperación ambos proporcionan resultados muy próximos, con HF-EME la sensibilidad que se consigue es mucho mayor.

Finalmente, los procedimientos de EME propuestos con cada dispositivo se utilizaron para evaluar su posible aplicación a la determinación de los analitos de interés en muestras de orina humana. Para ello se hicieron una serie de ensayos de recuperación en muestras de orina fortificadas con todos los compuestos estudiados a diferentes niveles de concentración y se determinaron, además, los correspondientes límites de detección (LODs) y de cuantificación (LOQs).

Las muestras se fortificaron y se microfiltraron (0.22 μm) y, posteriormente, se sometieron a los distintos procedimientos de EME sin aplicar ninguna dilución. No obstante, en estas condiciones, no fue posible llevar a cabo el análisis dado que la corriente que se generaba en todos los sistemas era tan elevada que, inmediatamente, se perdía la estabilidad debido al calentamiento y a los fenómenos de electrolisis que se producen cuando la corriente que atraviesa el sistema es excesiva. Por esta razón, fue necesario diluir las muestras de orina. Como puede verse, para cada dispositivo se aplicó una dilución diferente. Dicha dilución se realizó de forma que, durante el proceso, se produjera una intensidad de corriente que fuera, aproximadamente, del mismo orden de magnitud que la que se registró en las correspondientes condiciones óptimas de operación.

De este modo, los límites de detección y de cuantificación se calcularon como la mínima cantidad de analito con la que se obtienen picos cuya relación señal/ruido es 3 y 10 veces, respectivamente. Según los resultados, el sistema que emplea la configuración clásica (HF-EME) es el que proporciona los mejores resultados en términos de sensibilidad puesto que con éste se alcanzan los límites de detección y de cuantificación más bajos para todos los analitos empleados. Así, los LODs se situaron entre 0.1 ng mL^{-1} para SAL y 1.5 ng mL^{-1} para KTP mientras que los LOQs oscilaron entre los 0.3 ng mL^{-1} para SAL y los 3 ng mL^{-1} para KTP y DIC. Además, proporciona recuperaciones próximas al 100% para todos los compuestos.

Por su parte, el dispositivo FM-EME, al igual que el HF-EME, también permite obtener recuperaciones de extracción próximas al 100% para todos los AINEs. Sin embargo, dado que los factores de enriquecimiento que se alcanzan con este sistema son más bajos, es de esperar que la

sensibilidad que proporciona también sea algo menor. Así, para los límites de detección se obtuvieron valores comprendidos entre 0.8 ng mL^{-1} para SAL y 3.5 ng mL^{-1} para DIC, mientras que los límites de cuantificación se situaron entre 2.5 ng mL^{-1} para SAL y IBU y 10 ng mL^{-1} para el DIC.

En el lado opuesto se situaría el dispositivo microfluídico ($\mu\text{F-EME}$), pues al no existir la posibilidad de preconcentración de las muestras, es el sistema menos sensible y, por lo tanto, con el que se obtienen los mayores límites de detección y de cuantificación. En este caso, los LODs estaban comprendidos entre 100 ng mL^{-1} para SAL y 400 ng mL^{-1} para DIC y los LOQs, entre 250 ng mL^{-1} para SAL y 1700 ng mL^{-1} para DIC. Dicha sensibilidad, además, se ve reducida por la presencia de efecto matriz, hecho que se pone de manifiesto en las recuperaciones de extracción obtenidas a partir de las muestras fortificadas. Aunque los resultados eran reproducibles, en todos los casos se obtuvieron recuperaciones inferiores al 50%, lo cual condicionó, al mismo tiempo, la sensibilidad del método.

Tabla 3.2 Comparación de los resultados obtenidos con los sistemas de EME evaluados.

| Condiciones óptimas EME | | | | | | | |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------|--|------------------|--------|
| Sistema | SLM | Volumen/Flujo fase donadora | Volumen fase aceptora | pH fase donadora | pH fase aceptora | Voltaje | Tiempo |
| HF-EME | 1-octanol | 25 mL | 50 µL | 7 (KOH) | 12 (NaOH) | 60 V | 20 min |
| µF-EME | 1-octanol | 15 µL/min | 150 µL | 9 (KOH) | 10 (NH ₃ /NH ₄ Cl) | 10 V | 10 min |
| FM-EME | 1-octanol | 10 mL | 250 µL | 5 (agua mili-Q) | 12 (NaOH) | 80 V | 12 min |
| Resultados en agua ultrapura (mili-Q) ^a | | | | | | | |
| Sistema | | SAL ^b | KTP ^c | NAX ^b | DIC ^c | IBU ^b | |
| HF-EME | Factores de enriquecimiento | 134.3 ± 6.7 | 121.9 ± 4.1 | 106.1 ± 7.9 | 85.6 ± 3.7 | 115.9 ± 6.7 | |
| | % Recuperación | 26.9 ± 3.1 | 24.4 ± 1.6 | 21.2 ± 2.23 | 17.2 ± 0.4 | 23.2 ± 1.4 | |
| µF-EME | Factores de enriquecimiento | 0.98 ± 0.03 | 0.93 ± 0.04 | 0.96 ± 0.04 | 0.95 ± 0.06 | 1.03 ± 0.08 | |
| | % Recuperación | 97.9 ± 5.8 | 92.9 ± 2.9 | 95.9 ± 6.2 | 95.3 ± 4.1 | 102.9 ± 4.4 | |
| FM-EME | Factores de enriquecimiento | 13.7 ± 0.3 | 9.7 ± 0.9 | 8.8 ± 0.8 | 9.3 ± 0.6 | 8.9 ± 0.6 | |
| | % Recuperación | 34.3 ± 0.7 | 24.2 ± 2.1 | 22.1 ± 2.0 | 23.2 ± 1.6 | 22.7 ± 1.6 | |

(Continuación)

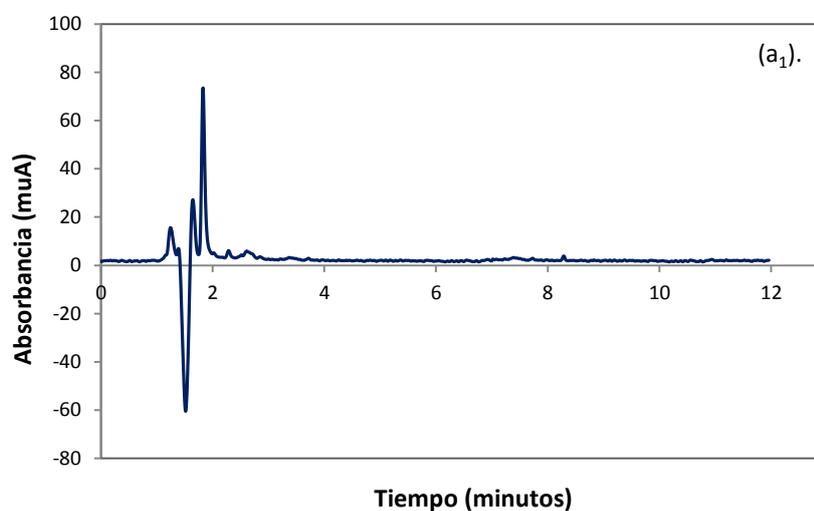
| Aplicación a muestras de orina ^a | | | | | | | |
|---|----------|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Sistema | Dilución | | SAL ^b | KTP ^c | NAX ^b | DIC ^c | IBU ^b |
| HF-EME | 1:1000 | % Recuperación | 99.9 ± 4.1 | 100 ± 3.6 | 85.2 ± 2.23 | 87.7 ± 2.4 | 97.1 ± 2.7 |
| | | LOD (ng mL ⁻¹) | 0.1 | 1.5 | 0.2 | 1 | 0.2 |
| | | LOQ (ng mL ⁻¹) | 0.3 | 3 | 0.5 | 3 | 0.5 |
| μF-EME | 1:50 | % Recuperación | 44.9 ± 1.8 | 41.9 ± 2.9 | 46.9 ± 2.2 | 39.3 ± 1.1 | 39.4 ± 1.6 |
| | | LOD (ng mL ⁻¹) | 100 | 150 | 100 | 400 | 350 |
| | | LOQ (ng mL ⁻¹) | 250 | 320 | 350 | 1700 | 1600 |
| FM-EME | 1:100 | % Recuperación | 86.3 ± 3.7 | 91.9 ± 3.1 | 78.1 ± 4.0 | 96.2 ± 3.6 | 87.7 ± 3.8 |
| | | LOD (ng mL ⁻¹) | 0.8 | 2.8 | 1.1 | 3.5 | 1 |
| | | LOQ (ng mL ⁻¹) | 2.5 | 8 | 2.9 | 10 | 2.5 |

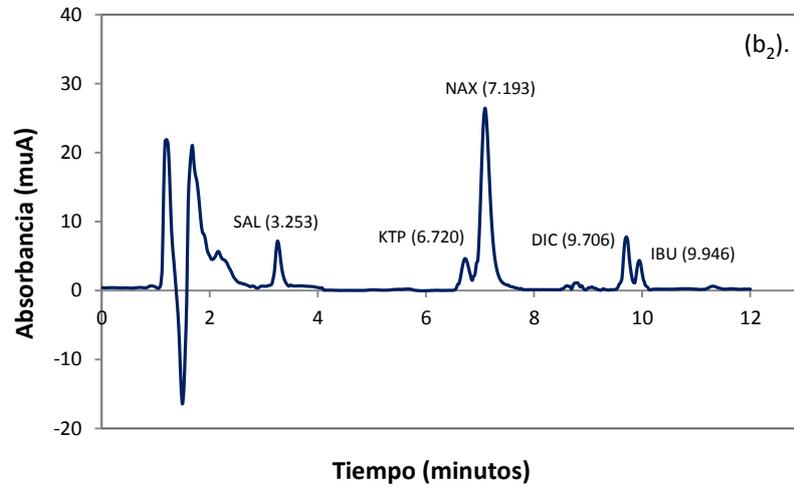
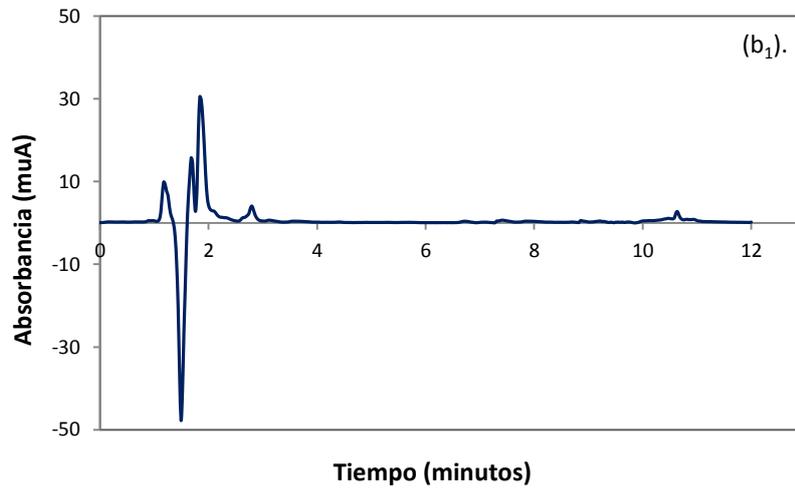
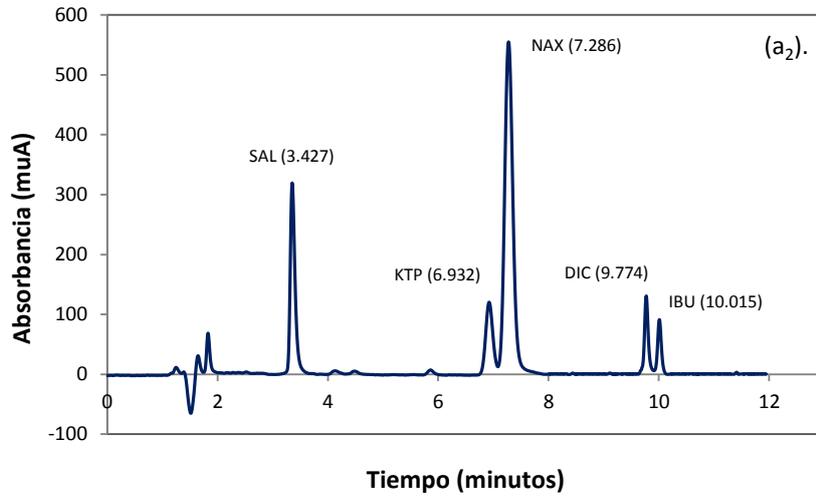
^aMedia correspondiente a tres determinaciones ± desviación estándar.

^bDetección por FLD

^cDetección por DAD

Además de los resultados obtenidos, otro factor importante a tener en cuenta es la selectividad y la eficacia de los métodos propuestos como técnicas de pretratamiento de muestras. En la Figura 3.20 se muestran, para cada sistema, los cromatogramas que resultan tras analizar un blanco de orina así como una muestra de orina fortificada con todos los antiinflamatorios no esteroideos estudiados. Como puede verse, todos los cromatogramas presentan una buena línea base y, en el caso de las muestras fortificadas, sólo se aprecian las señales correspondientes a cada uno de los AINEs estudiados. Es decir, en ningún caso se aprecian picos adicionales que puedan deberse a otros compuestos contenidos en la orina analizada, lo que evidencia la buena selectividad de todos y cada uno de los métodos así como la consecución de un excelente *clean-up*.





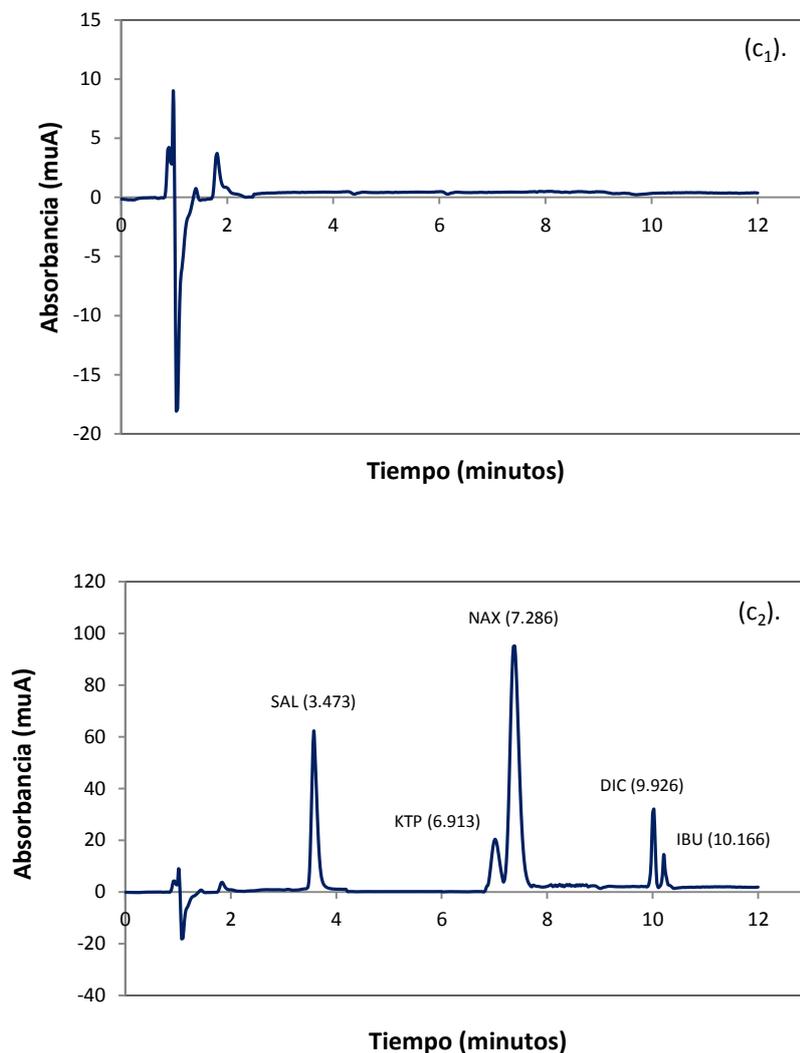


Figura 3.20. Cromatogramas de HPLC correspondientes a la EME de: (a₁) blanco de orina, dispositivo HF-EME (DAD, λ : 235 nm), (a₂) muestra de orina fortificada ($0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$), dispositivo HF-EME (DAD, λ : 235 nm), (b₁) blanco de orina, dispositivo μ F-EME (DAD, λ : 235 nm), (b₂) muestra de orina fortificada ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$), dispositivo HF-EME (DAD, λ : 235 nm), (c₁) blanco de orina, dispositivo FM-EME (DAD, λ : 235 nm), (b₂) muestra de orina fortificada ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$), dispositivo FM-EME (DAD, λ : 235 nm).

En cuanto a las posibles aplicaciones de cada dispositivo, éstas van a venir determinadas, en gran parte, por el tipo de muestra que se quiera analizar.

Así, en el caso de muestras de las que se puede disponer con facilidad de grandes cantidades, como ocurre con la orina, cualquiera de los tres métodos es válido para el análisis de las mismas tal y como se ha demostrado al comparar los distintos resultados obtenidos.

Por otra parte, cuando se trata de muestras en las que se espera encontrar una concentración de analitos baja, como pueden ser muestras de distintos tipos de agua, los procedimientos más adecuados serían aquellos que permitan preconcentrar las muestras. De este modo, el dispositivo μ F-EME quedaría prácticamente descartado frente a HF-EME y FM-EME, siendo HF-EME el que proporciona mejor sensibilidad.

Sin embargo, cuando la cantidad de muestra de la que se dispone es limitada, como puede ser el caso de ciertas muestras biológicas (sangre y de saliva), el dispositivo microfluídico sería el más apropiado puesto que es el que requiere un menor volumen de muestra. No obstante, hay que tener en cuenta que si la muestra requiere dilución, la cantidad de ésta que se consume en cada análisis va a depender del grado en el que se diluya, de forma que un dispositivo que inicialmente se hubiese descartado, podría ser susceptible de uso.

Como puede verse, la elección de un dispositivo u otro para llevar a cabo un determinado tipo de análisis no es tan sencilla como podría parecer a priori, pues son muchos los factores que van a influir a la hora de decidir cuál de ellos puede ser el más adecuado para el análisis que se quiere llevar a cabo. Así pues, aunque, en determinados casos puede que sea necesario realizar algunos ensayos preliminares que permitan decidir entre un dispositivo u otro, la elección final dependerá,

fundamentalmente, del tipo de muestra, del volumen que se disponga de la misma y de los niveles de sensibilidad que se requieran. Así mismo, deberán tenerse en cuenta otras consideraciones como la rapidez del análisis requerido, la instrumentación necesaria y la cualificación del personal que ha de realizar dicho análisis junto con la posibilidad de llevar a cabo el análisis in situ.

REFERENCIAS

[1] N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, S.T. Foss, D. Snakenborg, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electro membrane extraction, *Microfluid. Nanofluid.* 9 (4-5) (2010) 881-888.

[2] N.J. Petersen, S.T. Foss, H. Jensen, S.H. Hansen, C. Skonberg, D. Snakenborg, J.K. Kutter, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electro membrane extraction with online ultraviolet and mass spectrometric detection, *Anal. Chem.* 83 (1) (2011) 44-51.

[3] Y.A. Asl, Y. Yamini, S. Seidi, A novel approach to the consecutive extraction of drugs with different properties via on chip electromembrane extraction, *Analyst* 141 (2016) 311-318.

[4] Y.A. Asl, Y. Yamini, S. Seidi, M. Rezazadeh, Simultaneous extraction of acidic and basic drugs via on-chip electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 937 (2016) 61-68.

[5] Y.A. Asl, Y. Yamini, S. Seidi, B. Ebrahimpour, A new effective on chip electromembrane extraction coupled with high performance liquid chromatography for enhancement of extraction efficiency, *Anal. Chim. Acta* 898 (2015) 42-49.

[6] F. Zarghampour, Y. Yamini, M. Baharfara, M. Farajib, Simultaneous extraction of acidic and basic drugs *via* on-chip electromembrane extraction using a single compartment microfluidic device, *Analyst* 144 (4) (2019) 1159-1166.

- [7] W.A. Khan, Y. Yamini, M. Baharfara, M.B. Arainb, A new microfluidic-chip device for selective and simultaneous extraction of drugs with various properties, *New J. Chem.* 43 (24) (2019) 9689-9695.
- [8] A. Kazarine, M.C.R. Kong, E.J. Templeton, E.D. Salin, Automated liquid-liquid extraction by pneumatic recirculation on a centrifugal microfluidic platform, *Anal. Chem.* 84 (16) (2012) 6939-6943.
- [9] P. Mary, V. Studer, P. Tabeling, Microfluidic droplet-based liquid-liquid extraction, *Anal. Chem.* 80 (8) (2008) 2680-2687.
- [10] W.I. Wu, P. Rezai, H.H. Hsu, P.R. Selvaganapathy, 1-Materials and Methods for the Microfabrication of Microfluidic Biomedical Devices, *Microfluidic Devices for Biomedical Applications*, Woodhead Publishing 2013, 3-62.
- [11] P. Wägli, Y. C. Chang, A. Homsy, L. Hvozdar, H.P. Herzig, N.F. de Rooij, Microfluidic droplet-based liquid-liquid extraction and on-chip IR spectroscopy detection of cocaine in human saliva, *Anal. Chem.* 85 (15) (2013) 7558-7565.
- [12] S. Julich, H. Hotzel, C. Gärtner, D. Trouchet, M.F. El Metwaly Ahmed, N. Kemper, H. Tomaso, Evaluation of a microfluidic chip system for preparation of bacterial DNA from swabs, air, and surface water samples, *Biologicals* 44 (6) (2016) 574-580.
- [13] J. Jeon, N. Choi, H. Chen, J.I. Moon, L. Chen, J. Choo, SERS-based droplet microfluidics for high-throughput gradient analysis, *Lab Chip* 19 (4) (2019) 674-681.
- [14] G.G. Meena, A. Jain, J.W. Parks, A. Stambaugh, J.L. Patterson, A.R. Hawkinsc, H. Schmidt, Integration of sample preparation and analysis into an optofluidic chip for multi-target disease detection, *Lab Chip* 18 (23) (2018) 3678-3686.
- [15] M. Park, T.S. Seo, An integrated microfluidic device with solid-phase extraction and graphene oxide quantum dot array for highly sensitive and multiplex detection of trace metal ions, *Biosens. Bioelectron.* 126 (2019) 405-411.

- [16] J. Qi, B. Li, X. Wang, L. Fu, L. Luo, L. Chen, Rotational Paper-Based Microfluidic-Chip Device for Multiplexed and Simultaneous Fluorescence Detection of Phenolic Pollutants Based on a Molecular-Imprinting Technique, *Anal. Chem.* 90 (20) (2018) 11827-11834.
- [17] N.J. Petersen, J.S. Pedersen, N.N. Poulsen, H. Jensen, C. Skonberg, S.H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electromembrane extraction for monitoring drug metabolism in real time by electrospray ionization mass spectrometry, *Analyst* 137 (14) (2012) 3321–3327.
- [18] C. Huang, A. Gjelstad, K.F. Seip, H. Jensen, S. Pedersen-Bjergaard, Exhaustive and stable electromembrane extraction of acidic drugs from human plasma, *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 81-87.
- [19] C. Huang, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Exhaustive extraction of peptides by electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 853 (2015) 328-334.
- [20] C. Huang, L.E.E. Eibak, A. Gjelstad, X. Shen, R. Trones, H. Jensen, S. Pedersen-Bjergaard, Development of a flat membrane based device for electromembrane extraction: a new approach for exhaustive extraction of basic drugs from human plasma, *J. Chromatogr. A* 1326 (2014) 7-12.
- [21] C. Román-Hidalgo, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, M.J. Martín-Valero, M.A. Bello-López, Agar films containing silver nanoparticles as new supports for electromembrane extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (5) (2015) 1519-1525.
- [22] C. Román-Hidalgo, M.J. Martín-Valero, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, M.A. Bello-López, New nanostructured support for carrier-mediated electromembrane extraction of high polar compounds, *Talanta* 162 (2017) 32-37.
- [23] C. Román-Hidalgo, M.J. Martín-Valero, R. Fernández-Torres, M.A. Bello-López, Use of Polymer Inclusion Membranes (PIMs) as support for electromembrane extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and highly polar acidic drugs, *Talanta* 179 (2018) 601-607.

- [24] C. Román-Hidalgo, G. López-Pérez, M.J. Martín-Valero, M.A. Bello-López, Chitosan tailor-made membranes as biopolymeric support for electromembrane extraction, *Talanta* 199 (2019) 290-295.
- [25] E. Carasek, J. Merib, Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: a review, *Anal. Chim. Acta* 880 (2015), 8-25.
- [26] L. Ryšavá, M. Dvořák, P. Kubáň, The effect of membrane thickness on supported liquid membrane extractions in-line coupled to capillary electrophoresis for analyses of complex samples, *J. Chromatogr. A* 1596 (2019) 226-232.
- [27] M. Ramos-Payán, M.A. Bello-López, R. Fernández-Torres, M. Villar-Navarro, M. Callejón-Mochón, Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples, *Talanta* 85 (1) (2011) 394–399.
- [28] A. Slampová, P. Kubáň, P. Boček, Quantitative aspects of electrolysis in electromembrane extractions of acidic and basic analytes, *Anal. Chim. Acta* 887 (2015) 92-100.
- [29] A. Slampová, P. Kubáň, P. Boček, Additional considerations on electrolysis in electromembrane extraction, *J. Chromatogr. A* 1429 (2016) 364-368.
- [30] P. Kubáň, P. Boček, The effects of electrolysis on operational solutions in electromembrane extraction: The role of acceptor solution, *J. Chromatogr. A* 1398 (2015) 11-19.

CAPÍTULO 4. Modificación de la membrana líquida para la extracción mediante electromembrana de antiinflamatorios no esteroideos

CHAPTER 4. SUMMARY

In this chapter, the modification of the SLM in EME procedures is proposed with the aim to increase the SLM-analyte interaction to enhance the mass transfer from donor to acceptor solution. For this purpose, two additives of different nature have been employed: silver nanoparticles and a cationic carrier.

The modified solvents were used as liquid membranes for the electrokinetic extraction of five non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in aqueous samples (salicylic acid (SAC), ketoprofen (KTP) naproxen (NAX), diclofenac (DIC) and ibuprofen (IBU)) to evaluate their applicability as SLM or FLM in EME techniques. The obtained results were compared with those obtained with the pure solvent.

First, the influence of the silver nanoparticles (AgNPs) was analysed. Spherical silver nanoparticles were synthesized following a fast, simple and reproducible method based on the chemical reduction of silver (I) salts. Then, AgNPs were directly transferred from the aqueous medium of synthesis to the organic solvent of interest using a simple procedure, similar to a liquid-liquid extraction. The resulting dispersion was tested as liquid membrane in HF-EME and μ -EME systems. In both cases, the presence of AgNPs in the liquid membrane, failed to improve the extraction efficiency regarding the one obtained with the pure solvent.

Second, the influence of different amounts of a cationic carrier (Aliquat®336) dissolved in the liquid membrane was evaluated. The study was carried out using the FM-EME system at the optimal operational

conditions previously established in chapter 3. In order to ensure the system stability in the presence of the carrier, other parameters such as the support thickness, the electrode geometry, and the organic solvent used as SLM were also evaluated. Using 1-nonanol modified with 2.5 % (w/v) of Aliquat®336 as SLM, the results improved in more than 56% the ones obtained in the presence of 1-octanol.

Once the optimal conditions were established, EME procedure was performing at 80 volts for 12 minutes using a 25 μm thickness polypropylene flat membrane as support of 1-nonanol modified with 2.5 % (w/v) of Aliquat®336 as liquid membrane. The analytes were extracted from 10 mL of an aqueous sample solution (pH 5.2), continuously stirred at 400 rpm, to 250 μL of an aqueous acceptor solution at pH 12 (NaOH 10 mM adjusted). In these conditions, extraction recoveries were in the range 38-53%.

Finally, the target analytes were successfully extracted from human urine samples applying the proposed EME procedure.

Hasta la fecha, la mayor parte de las publicaciones de EME describen el uso de disolventes orgánicos puros o mezclas de los mismos como membrana líquida soportada para llevar a cabo la extracción. No obstante, la necesidad de añadir a la SLM un reactivo formador de pares iónicos para lograr extraer compuestos de elevada polaridad, parece indicar que la presencia de aditivos en el disolvente orgánico puede mejorar la eficacia de la extracción. En ese sentido, las investigaciones han intentado potenciar la transferencia de masa de diferentes maneras, bien modificando la SLM o incluso la propia fase donadora.

En el primer caso, se han conseguido membranas líquidas más selectivas o específicas mediante:

a. El empleo de *carriers* o transportadores. Además de los *carriers* ya mencionados, como el D2EHP y el TEHP, aminas como el bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) y algunos éteres corona, como el éter 15-corona-5 y el éter 18-corona-6, se han aplicado con éxito para la extracción de compuestos de elevada polaridad [1] así como péptidos [2] e iones metálicos [3,4], respectivamente. También se han probado materiales funcionales dispersos en la SLM, como nanotubos de carbono (CNTs) [5-7], nanosorbentes de grafeno como óxido de grafeno [8-10] y fullerenos [11] y nanopartículas metálicas [12-14] para el análisis de compuestos de naturaleza ácida y básica en diferentes matrices.

En ambos casos, se consigue una mejora en la migración ya que estos aditivos incrementan la interacción de los analitos presentes en la fase donadora con la SLM.

b. Mezclas, fundamentalmente binarias, de diferentes disolventes orgánicos. La finalidad de este tipo de mezclas es aumentar la estabilidad de la SLM mediante una disminución de la conductividad y, al mismo tiempo, modificar la viscosidad de la misma para incrementar su permeabilidad [15-19].

En el segundo caso, que implica la modificación de la fase donadora, se han utilizado, esencialmente, surfactantes tanto catiónicos [10] como aniónicos [20] y no iónicos [21,22] como *carriers* para la extracción de compuestos de distinta polaridad.

Por lo tanto, en este capítulo se propone, por un lado, la modificación de la membrana líquida con nanopartículas de plata y, por otro, con un *carrier* catiónico (Aliquat®336) para mejorar la eficacia de la EME de los antiinflamatorios no esteroideos objeto de estudio. De este modo, la inclusión de nanopartículas de plata en la membrana líquida tiene como finalidad aprovechar las propiedades electrónicas de las mismas para homogeneizar e incrementar el campo eléctrico que se genera a través del disolvente orgánico que separa ambas fases acuosas. Por su parte, mediante el empleo de Aliquat®336 disuelto en la membrana líquida, se pretende aumentar la solubilidad y el paso de los AINEs a través de la misma aprovechando la capacidad del *carrier* para formar pares iónicos con este tipo de compuestos.

4.1. MATERIALES DE TAMAÑO NANOMÉTRICO: NANOPARTÍCULAS

Durante las últimas décadas, la investigación en ciencia y tecnología se ha centrado en la fabricación de estructuras atómicas y materiales de dimensiones nanométricas, dando lugar a lo que se conoce como Nanotecnología [23]. Así, la Nanotecnología puede definirse como una ciencia interdisciplinaria dedicada al control y manipulación de la materia a escala nanométrica para el aprovechamiento de las propiedades de la materia a ese nivel.

En ese sentido, una de las unidades básicas de construcción para diversas aplicaciones de la nanotecnología la constituyen las nanopartículas. Las nanopartículas, son partículas más grandes que los átomos y las moléculas que no obedecen a la química cuántica ni a las leyes de la física clásica, sino que poseen características propias. Aunque no existe una definición única de nanopartícula, la mayoría de los autores consideran que son porciones de materia diferenciadas del medio donde se encuentran, que se comportan como una unidad en su conjunto y cuya longitud, al menos en alguna de sus dimensiones, está entre 1 y 100 nm [24,25]. El interés sobre las especies químicas de tamaño nanométrico se debe, fundamentalmente, a la gran variedad de nuevas propiedades y aplicaciones que ofrece el empleo de materiales de este tamaño [26].

En lo que respecta a la clasificación de las mismas, es difícil encontrar una clasificación única de las nanopartículas ya que éstas se pueden clasificar atendiendo a un gran número de factores, entre los que cabe destacar su naturaleza química, su tamaño, su morfología, el medio donde se encuentran dispersas, el estado de dispersión y las modificaciones

superficiales que puedan presentar. Una clasificación muy empleada, es aquella que hace referencia a su composición, en la que se pueden distinguir tres grandes categorías: nanopartículas de origen natural (de origen biológico, mineral o medioambiental), nanopartículas antropogénicas (aquellas que se producen de forma involuntaria como resultado de la actividad humana) y nanopartículas artificiales o manufacturadas (las que se generan de forma deliberada mediante procesos nanotecnológicos). A su vez, las nanopartículas artificiales o manufacturadas se clasifican en cuatro grandes grupos según su composición, diferenciándose [24,25]:

a. *Nanopartículas de carbono*. En este grupo se encuentran todas aquellas nanopartículas basadas en la tecnología del carbono tales como los fullerenos, los nanotubos y el grafeno.

b. *Nanopartículas metálicas*. En este grupo, se incluyen dos tipos de nanopartículas cuyas propiedades varían en función de su tamaño. Por un lado, están las nanopartículas formadas por un metal en estado de oxidación cero, normalmente metales nobles como el oro o la plata. Por otro lado, están las nanopartículas semiconductoras o *Quantum Dots*, formadas, generalmente, por dos elementos siendo uno de ellos, como mínimo, un metal. Compuestos como el CdS, PbS o el Ag₂S son un ejemplo de este tipo de nanopartículas.

c. *Dendrimeros*. Se trata de macromoléculas poliméricas sintéticas de estructura arborescente. Es decir, se trata de polímeros que se obtienen a partir de unidades ramificadas.

d. *Nanocomposites*. Son mezclas formadas por, al menos, dos componentes. Tienen la capacidad de combinar nanopartículas con otros materiales de igual o mayor tamaño. Al mezclar ambos materiales, se consigue un efecto sinérgico mediante el cual el material que se obtiene presenta mejores propiedades que los de partida.

En teoría, las nanopartículas se pueden sintetizar a partir de casi cualquier producto químico, aunque la mayoría de las nanopartículas que se utilizan hoy en día se obtienen a partir de metales de transición, silicio, carbono y óxidos metálicos [23]. Un aspecto fundamental de la síntesis de nanopartículas es su estabilización, de tal forma que pueda mantenerse su tamaño y su forma a lo largo del tiempo. En general, los métodos de síntesis de nanopartículas pueden agruparse en dos grandes grupos [27]:

a. *Métodos top-down*. Permiten obtener nanopartículas mediante la división de un material macroscópico en porciones más pequeñas. Este enfoque involucra métodos como la molienda o el desgaste, así como métodos químicos que emplean ácidos fuertes o ultrasonidos para fragmentar el material de partida.

b. *Métodos bottom-up*. Implican métodos químicos en los que las nanopartículas se sintetizan mediante condiciones que favorecen la posterior formación de partículas de tamaño nanométrico. Entre ellos cabe destacar la síntesis fotoquímica, la ablación por láser, la irradiación con microondas y, sobretodo, la reducción química. Estos métodos, presentan una serie de ventajas entre las que destacan un mayor control de los tamaños de las nanopartículas así como un menor grado de polidispersión del sistema.

La principal ventaja del uso de nanopartículas, deriva de las excepcionales propiedades físicas y químicas que presentan como consecuencia de su reducido tamaño. Mientras que a nivel macroscópico las propiedades de los materiales varían generalmente de forma lineal, la reducción de sus dimensiones, hasta llegar a niveles nanométricos, hace que la configuración electrónica de los mismos sea significativamente diferente a la del mismo material a escala macroscópica, siendo esta diferencia de configuración la que provoca los cambios en sus propiedades [24,25].

De este modo, en un sistema nanométrico todas las propiedades son extensivas y como tal dependen de la masa del mismo y, por extensión, de su forma y tamaño, características que por lo general se controlan a través del método de síntesis. Como resultado, se pueden obtener nanopartículas de muy diversos tamaños y formas como por ejemplo, esféricas, cilíndricas, triangulares, elipsoidales, tubulares, helicoidales y cúbicas entre muchas otras [28,29]. Así, dado que las propiedades de un nanomaterial no sólo dependen de su naturaleza, un mismo nanomaterial puede tener diferentes usos simplemente modificando su forma y tamaño, lo cual ha generado un crecimiento exponencial de las aplicaciones de los mismos.

Otra razón importante por la cual las propiedades de las nanopartículas se pueden ver modificadas, es que la relación entre el número de átomos superficiales y el tamaño de partícula es de carácter exponencial. Es decir, las nanopartículas presentan una elevada área superficial por unidad de volumen y, por consiguiente, una mayor superficie de contacto con el entorno, por lo que en los sistemas nanométricos las superficies juegan un papel más importante que el que

tienen en los sistemas macroscópicos. Por lo tanto, las propiedades relacionadas con la superficie del material como las eléctricas, las mecánicas, las magnéticas, las ópticas o las químicas son diferentes a las del mismo material a escala no nanométrica y, a su vez, dependen de la forma, el tamaño y la distribución de los tamaños de partícula [25,30].

4.1.1. Nanopartículas en Química Analítica

En el marco de la Química Analítica, las nanopartículas han sido ampliamente utilizadas como herramientas para mejorar o desarrollar métodos analíticos que permitan la determinación de nuevos analitos en matrices diferentes y complejas. La Figura 4.1 resume las principales aplicaciones analíticas de las nanopartículas en este campo. Como se aprecia, pueden emplearse en las tres etapas del procedimiento analítico: tratamiento de muestra, separación instrumental y detección [31].

Así mismo, las nanopartículas ofrecen la posibilidad de ser modificadas superficialmente, lo que permite obtener nanopartículas más específicas, mediante la funcionalización con distintos tipos de moléculas según la aplicación para la que hayan sido diseñadas. Las modificaciones más comunes, consisten en la adsorción de tensioactivos o ligandos cargados, polímeros sintéticos o naturales, antígenos, etc. Esta característica es de gran valor en técnicas analíticas de extracción, ya que permite obtener nanopartículas selectivas y específicas para determinados analitos, facilitando así la extracción de los mismos en presencia de otros.

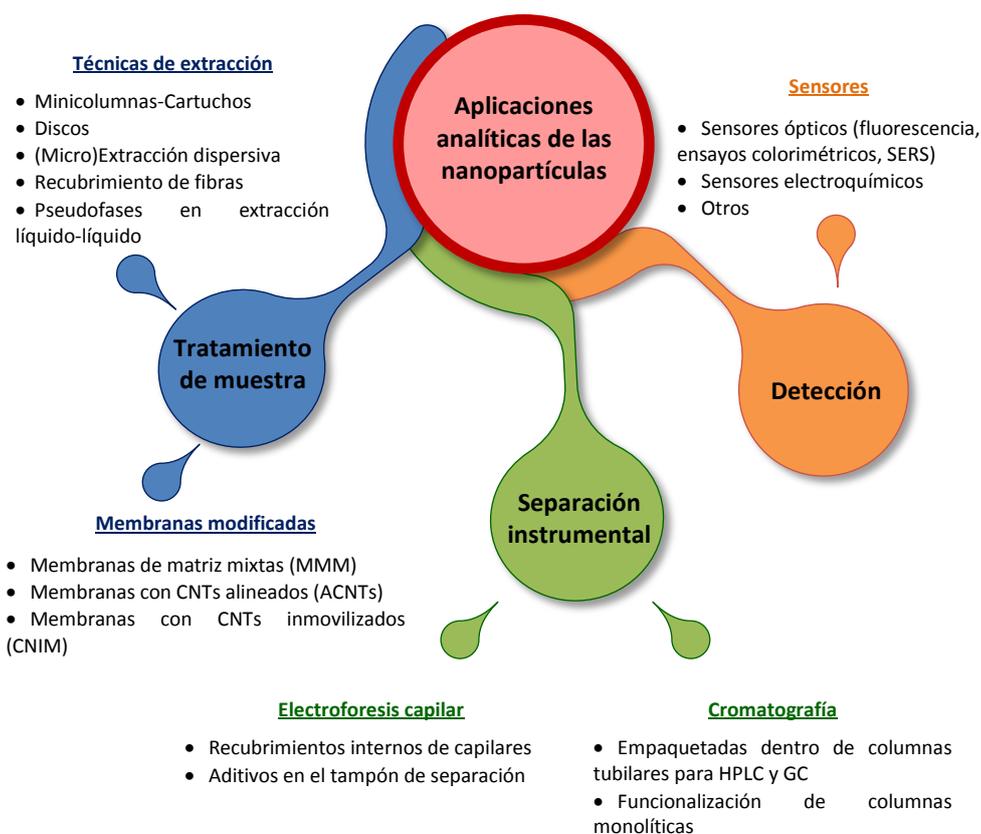


Figura 4.1. Aplicaciones analíticas de las nanopartículas [31].

4.1.2. Nanopartículas metálicas

Las características mecánicas, magnéticas, catalíticas, electrónicas y ópticas de las nanopartículas se pueden adaptar fácilmente en función del tipo de aplicación que se les quiera dar, lo que las hace muy atractivas para su explotación en múltiples sectores como la química, la física, la medicina, la biología, la ciencia de materiales, la industria textil y la industria alimentaria [23].

De entre todos los tipos de nanopartículas, las basadas en metales o en óxidos metálicos han despertado un gran interés en las áreas científicas

y tecnológicas debido a sus excelentes propiedades ópticas, magnéticas, electrónicas, catalíticas y biológicas, las cuales difieren significativamente de las del metal en cuestión a nivel macroscópico ya que están relacionadas con su tamaño, forma, composición, cristalinidad y estructura, por lo que pueden ser interesantes desde el punto de vista de su aplicación práctica. Además, son fáciles de sintetizar y modificar químicamente. [32,33]. Entre estas propiedades, cabe destacar una excelente conductividad eléctrica, actividad catalítica y estabilidad química, lo que las convierte en buenas candidatas para la fabricación de nanosensores, nanorresonadores y nanorreactores entre otros dispositivos [25,33,34]. Teniendo en cuenta que estas propiedades dependen de la forma y el tamaño de las partículas, el control de ambas variables a través de la síntesis resulta de gran importancia para conseguir adaptar las propiedades del material a una aplicación en concreto.

4.2. NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Entre las diversas estructuras metálicas, las nanopartículas de metales nobles se han convertido en las más investigadas debido a sus propiedades ópticas, catalíticas y eléctricas así como por sus potenciales aplicaciones en microelectrónica [33,35].

En particular, las nanopartículas de plata han despertado un gran interés en los últimos años debido a que presentan unas propiedades físicas, químicas y biológicas únicas, normalmente asociadas con los metales nobles (elevada conductividad térmica y eléctrica, estabilidad química, actividad catalítica y resistencia de contacto relativamente baja) [25] junto con otras más específicas que dependen fundamentalmente de

la morfología, la estructura cristalina, las dimensiones y la distribución de los tamaños de las partículas (actividad antibacteriana, comportamiento óptico no lineal, etc.) [33,35]. Como consecuencia, las nanopartículas de plata se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología y la nanoelectrónica, por lo que hay un creciente interés en encontrar rutas que permitan producir dispersiones de nanopartículas de plata en grandes cantidades [23,35].

4.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata

Como resultado del gran desarrollo que ha experimentado la nanociencia en los últimos años, se han descrito diferentes métodos físicos y químicos para la obtención de nanopartículas de plata [26].

Entre las técnicas físicas empleadas, se encuentran las ya mencionadas síntesis fotoquímica, la ablación láser, los procesos de transferencia de fase, la microemulsión o el tratamiento con microondas. Todas ellas, se emplean para preparar nanopartículas de plata tanto en fase sólida como en disolución [36].

Por su parte, los métodos de síntesis química son más versátiles y permiten la obtención de nanopartículas de plata de manera sencilla. Los más empleados, debido a su simplicidad, a su bajo coste, a su reproducibilidad, a su capacidad para producir grandes cantidades de AgNPs y a que permiten trabajar en condiciones de presión y temperatura ambiental [24,37,38], son los métodos de reducción química, basados en la reducción de sales de plata (I) en disoluciones acuosas.

La reducción de Ag (I) en disolución acuosa, generalmente produce plata coloidal con tamaños de partículas bien controlados del orden de los nanómetros [39]. No obstante, en estos métodos de síntesis es muy importante controlar no sólo el tamaño de las AgNPs que se forman, sino también su forma y la distribución de tamaños mediante el ajuste de los parámetros que intervienen en la reacción, de forma que se obtenga un conjunto de nanopartículas monodispersas con unas propiedades determinadas [33,36,37].

En ese sentido, se han propuesto diversos métodos para la síntesis de AgNPs con los que se obtienen nanopartículas de diferentes formas y tamaños, algunos de los cuales incluyen el uso de un tercer reactivo que actúa como agente estabilizante [37]. En general, la síntesis de nanopartículas metálicas en disolución se lleva a cabo mediante el empleo de los siguientes componentes: (a). un precursor metálico; (b). un agente reductor y (c). un agente estabilizante para prevenir la agregación de las nanopartículas en disolución que, según el método de síntesis, puede ser un tercer reactivo o bien un exceso del propio agente reductor [26].

El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones plata (I), consta de dos etapas diferentes: una primera etapa de nucleación seguida de una etapa de crecimiento (Figura 4.2). El proceso de nucleación requiere una alta energía de activación, ya que lleva implícita la reducción de la plata iónica a plata metálica, mientras que el proceso de crecimiento requiere una menor energía de activación, ya que implica la formación y estabilización de las nanopartículas. Por su parte, propiedades como el tamaño, la forma, el color y la monodispersidad de las nanopartículas sintetizadas dependerán de las

velocidades relativas de ambas etapas, las cuales pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción tales como la concentración de reactivos, la temperatura, el pH, la capacidad reductora del reductor químico, etc. [26,40].

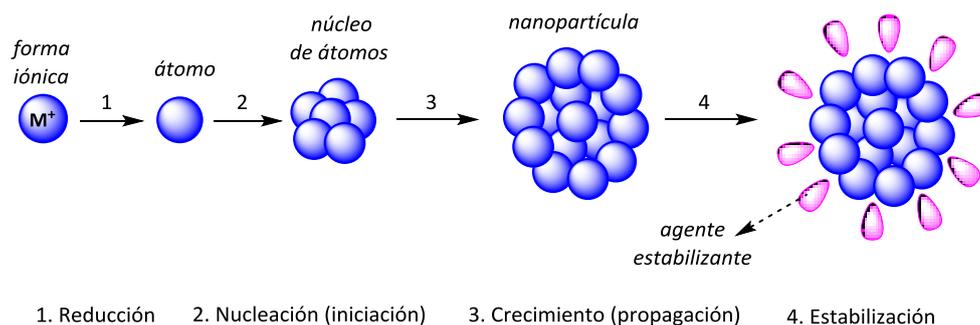


Figura 4.2. Etapas de formación de nanopartículas de plata por reducción química en disolución.

El tamaño de las nanopartículas resultantes así como su morfología dependen de los reactivos que intervienen en la síntesis, especialmente del agente reductor. De este modo, cuanto más fuerte es el agente reductor empleado menor es el tamaño y la dispersión de las nanopartículas que se obtienen, ya que la velocidad de reacción de la etapa de nucleación es mayor, y viceversa [24,41,42]. Así mismo, el tamaño puede variar dependiendo de la cantidad de iones de Ag (I) que se reduzcan a plata metálica, Ag (0) y, posteriormente, del número de átomos de Ag (0) que se unan entre sí para formar las AgNPs. Por esta razón, la cantidad de agente reductor que se emplee debe ser suficiente como para estabilizar las AgNPs formadas pero sin que se produzca un aumento excesivo de la fuerza iónica total de la disolución, ya que esto podría provocar la agregación de las mismas.

La mayoría de los métodos de síntesis de AgNPs por reducción química emplean como precursor metálico nitrato de plata (AgNO_3) o cloruro de plata (AgCl), mientras que como agentes reductores se utilizan diversos reactivos que, en función de su capacidad reductora, se pueden dividir en [41,42]:

a. Reductores fuertes, como el borohidruro de sodio (NaBH_4), el hidrógeno elemental (H_2) o el monóxido de carbono (CO).

b. Reductores moderados, como el citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), la hidracina (N_2H_4) o alcoholes a reflujo prolongado.

c. Reductores débiles, como la fructosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) o la glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

En cuanto a los agentes estabilizantes, se ha comprobado que los reactivos más eficaces son los compuestos poliméricos tales como la polivinilpirrolidona (PVP), el polivinilalcohol (PVA), el poliacrilonitrilo (PA) o el polietilenglicol (PEG) entre otros, aunque la presencia de ligandos o tensioactivos cargados también puede contribuir a estabilizar las AgNPs formadas [43].

4.2.2. Aplicaciones de las nanopartículas de plata

Debido a sus excelentes propiedades, en los últimos años las nanopartículas de plata han despertado gran interés, encontrando múltiples aplicaciones en ámbitos como el textil, el alimentario, el cosmético, el biomédico o el médico-farmacéutico [44], y que van desde el almacenamiento y producción de energía hasta la medicina de diagnóstico

y tratamiento de enfermedades. Se emplean en la fabricación de electrodos, chips, dispositivos de almacenamiento de datos, catalizadores, sensores químicos, biosensores, células de combustibles e incluso tintas de impresoras [32,45,46]. Así mismo, se encuentran presentes en consumibles diarios, sistemas de depuración de agua, productos para la higiene del hogar, pinturas o electrodomésticos [47-48].

Una de las principales características de la plata metálica y que ha desencadenado el desarrollo de múltiples productos en los que las AgNPs están presentes, es su eficaz actividad antimicrobiana, antiviral y antimicótica, razón por la cual encuentran aplicación en numerosos dispositivos destinados, principalmente, para su uso en el ámbito médico [26]. Al igual que otras propiedades, la actividad antimicrobiana se puede ajustar controlando el tamaño y la forma de las AgNPs durante la síntesis de las mismas [36]. Además, se ha demostrado que las AgNPs pueden emplearse como agente cicatrizante y que presentan gran capacidad para controlar procesos antiinflamatorios [26]. Como resultado, se han desarrollado apósitos y vendajes para el tratamiento de quemaduras, heridas y úlceras, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con AgNPs para así evitar el crecimiento bacteriano [23,49,50]. También se ha evaluado su utilización contra el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración mantenida de fármaco en sangre o un direccionamiento específico a células u órganos [23], y se utilizan en biosensores o marcadores biológicos con el fin de detectar y tratar células cancerosas, ya que la plata tiene la propiedad de reducir el tamaño de estas células y eliminarlas cuando se las somete a elevadas concentraciones de nanopartículas [24,26].

Las propiedades antibacterianas de las AgNPs, también encuentran aplicación en la agricultura, en la industria textil, y en la industria alimentaria. En la agricultura se emplean en los fungicidas y bactericidas [26]. En la industria textil, mediante la producción de AgNPs en fibras sintéticas o naturales, se potencia la actividad iónica de la plata debido a la mayor cantidad de iones liberados, lo que conduce rápidos efectos antimicrobianos o antiolor [51]. En la industria alimentaria, se emplean en la fabricación de materiales para el envasado de alimentos, ya que son capaces de reducir hasta en un 90% el crecimiento de microorganismos, por lo que constituyen una alternativa muy eficaz frente a otros métodos de conservación que emplean la radiación, el tratamiento térmico, el almacenamiento a baja temperatura, o la introducción de aditivos antimicrobianos [23].

4.3. PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1. Selección del método de síntesis de nanopartículas de plata

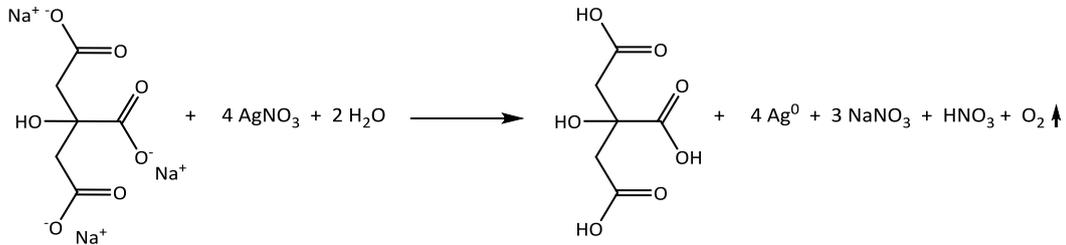
Con objeto de elegir el método más adecuado para llevar a cabo la síntesis de AgNPs, se evaluaron diferentes procedimientos descritos en la bibliografía que incluían desde métodos físicos a métodos químicos y biológicos que permitían obtener nanopartículas de diferentes tamaños y algunas de las formas mencionadas en el apartado 4.1. De todos ellos, se seleccionaron los métodos que proporcionaban nanopartículas mediante rutas de síntesis química basadas en la reducción de sales de plata (I) debido, principalmente, a su simplicidad, a su mayor versatilidad, a su elevada reproducibilidad y a la posibilidad que ofrecen de sintetizar coloides monodispersos con una estrecha distribución del tamaño de

partícula. Como ya se ha comentado, estos métodos pueden agruparse en dos tipos según empleen o no un tercer reactivo como agente estabilizante. Ante la posibilidad de que la presencia de estos compuestos pudiera interferir en el proceso de extracción electrocinética, se optó por los métodos de síntesis que incluyen únicamente un precursor metálico y un agente reductor.

De este modo, las AgNPs empleadas en este estudio se prepararon según los métodos propuestos por P.V. Dong et al. [36]. En este trabajo, se describen varias rutas sintéticas para la obtención de nanopartículas de plata con diferentes formas y tamaños, pero se seleccionaron las dos que proporcionan nanopartículas esféricas a través de mecanismos de reducción química. La elección de nanopartículas de plata con forma esférica se debió, esencialmente, a los buenos resultados obtenidos al emplear AgNPs con esta morfología en diferentes sistemas de EME en trabajos previos publicados en el Grupo de Investigación en el que se desarrolla esta Tesis Doctoral [13,52].

El primer método de síntesis, implicaba la obtención de AgNPs esféricas mediante la reducción de una disolución de nitrato de plata (AgNO_3) utilizando citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) como reductor químico. Para ello, se preparó una disolución de nitrato de plata 1.0 mM y otra de citrato de sodio al 1% (p/v). Seguidamente, se calentaron a ebullición 50 ml de la disolución de AgNO_3 con agitación continua y se adicionaron, gota a gota, 5 mL de la disolución de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$. La reacción se dejó continuar hasta que la disolución adquirió un color amarillo verdoso, tras lo cual se detuvieron la agitación y la calefacción. La dispersión resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente.

El mecanismo de reacción de este método de síntesis puede representarse según la siguiente reacción:



El exceso de citrato de sodio que queda sin reaccionar se adsorbe sobre la superficie de las AgNPs, dotándolas de carga negativa. Al estar cargadas, se repelen entre sí y, como resultado, permanecen estables en disolución sin necesidad del uso de otros agentes estabilizantes. Por lo tanto, el citrato de sodio desempeña una doble función, ya que actúa como reductor en la reacción y como agente estabilizante de las nanopartículas formadas.

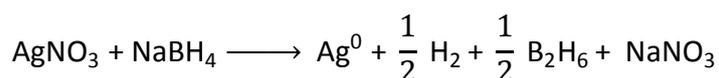
Mediante este procedimiento, se obtiene una dispersión coloidal de AgNPs con una distribución de tamaños comprendida entre 15 y 60 nm de diámetro y una absorbancia del plasmón superficial en torno a los 424 nm.

En el segundo método de síntesis, se sustituyó el citrato de sodio, reductor de naturaleza orgánica, por un reductor de naturaleza inorgánica y más eficaz, el borohidruro de sodio (NaBH_4). Al sustituir el citrato de sodio por un reductor más fuerte, se consigue mejorar la distribución de tamaños de las AgNPs resultantes.

La síntesis se realizó según el siguiente procedimiento: en primer lugar se prepararon una disolución de NaBH_4 2.0 mM y una disolución de

AgNO₃ de concentración 1.0 mM. A continuación se tomaron 50 ml de la disolución de NaBH₄ y se enfriaron en un baño de hielo durante 20 minutos con agitación constante. Seguidamente, se añadieron, gota a gota, 2 ml de la disolución de AgNO₃, manteniendo la agitación en todo momento a fin de que la síntesis fuese lo más homogénea posible. Una vez añadido todo el AgNO₃, se paró la agitación para evitar la agregación de las nanopartículas formadas, tras lo cual resultaba una dispersión de color amarillo.

La reacción química que tiene lugar durante la síntesis es la siguiente:



Según este proceso, el ión plata (I) se reduce a plata metálica, mientras que el borohidruro de sodio pasa a diborano tras la oxidación de un átomo de hidrógeno para dar hidrógeno molecular. Al igual que ocurría con el citrato de sodio, el exceso de borohidruro de sodio que no reacciona se adsorbe sobre la superficie de las nanopartículas de plata, otorgándoles una carga negativa que dificulta su agregación como consecuencia de la repulsión electrostática que se produce entre las mismas. Por lo tanto, en este caso, el borohidruro cumple también una doble función ya que actúa como reductor químico y como agente estabilizante.

Como resultado, se obtuvieron nanopartículas esféricas de tamaño comprendido entre 1 y 12 nm, con un diámetro medio de 4 nm, una absorbancia del plasmón superficial en torno a los 400 nm y una anchura de pico a la altura media de entre 50 y 70 nm.

Tanto en el primer como en el segundo método, la síntesis y la formación de la dispersión coloidal de AgNPs, puede resumirse según el esquema que se representa en la Figura 4.3.

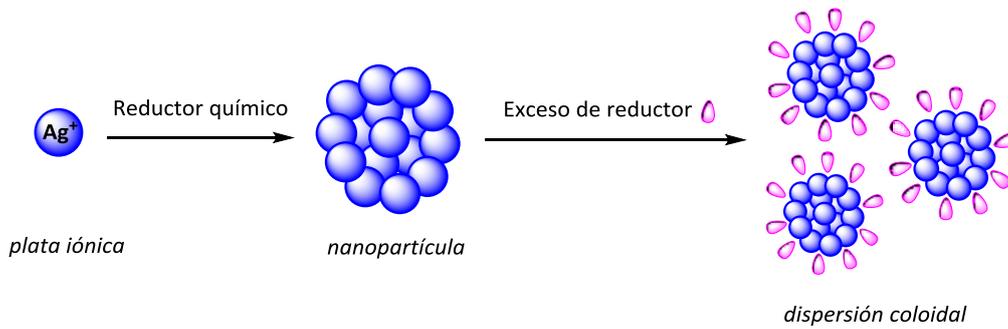


Figura 4.3. Formación y estabilización de las nanopartículas de plata según un procedimiento de reducción química [26].

En la siguiente tabla (Tabla 4.1), se resumen las condiciones de reacción así como las características de las AgNPs obtenidas con cada una de las rutas sintéticas descritas.

Tabla 4.1. Condiciones de síntesis y características estructurales de las AgNPs sintetizadas.

| Método | Reactivos | Volumen (ml) | Forma de las AgNPs | Tamaño medio de las AgNPs (nm) | Máximo de absorción (λ nm) |
|--------|--|--------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | AgNO_3 1.0 mM | 50 | Esféricas | 15-60 | 424 |
| | $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ 1% (p/v) | 5 | | | |
| 2 | AgNO_3 1.0 mM | 2 | Esféricas | 1-12 | 400 |
| | NaBH_4 2.0 mM | 50 | | | |

De estos dos métodos, finalmente, se seleccionó para la posterior modificación de la membrana líquida, el que emplea NaBH_4 como reductor

químico puesto que, al contrario del que utiliza $C_6H_5O_7Na_3$, proporcionaba una dispersión de nanopartículas mucho más estable en el tiempo y reproducible en cuanto a la forma y tamaño de las mismas.

4.3.2. Caracterización de las nanopartículas de plata

La caracterización de las nanopartículas sintetizadas, resulta de gran utilidad a la hora de entender y controlar tanto la síntesis como las aplicaciones de las mismas. Existen una gran variedad de técnicas analíticas que permiten llevar a cabo la caracterización de nanopartículas, tales como la microscopía de transmisión electrónica (*Transmission Electron Microscopy, TEM*), la microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy, SEM*), la microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy, AFM*), la dispersión dinámica de la luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*), la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, FTIR*), la espectroscopía de fotones de rayos X (*X-Ray Photoelectron Spectroscopy, XPS*), la difracción de rayos X en polvo (*X-Ray Powder Diffraction, XRD*), y la espectroscopía ultravioleta visible (*Ultraviolet Visible Spectroscopy, UV-vis*) [53].

De todas ellas, las que se utilizan con mayor frecuencia para la determinación de la estructura, la morfología y la distribución de tamaños son la microscopía de transmisión electrónica (TEM), la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la dispersión dinámica de la luz (DLS), mientras que la topografía se estudia mediante la microscopía de fuerza atómica (AFM) [54].

La dispersión coloidal de AgNPs sintetizada según el método seleccionado se caracterizó por espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis) y microscopía de transmisión electrónica (TEM).

4.3.2.1. Caracterización por espectroscopía ultravioleta-visible

La espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis), es una de las técnicas más empleadas para caracterizar las nanopartículas metálicas. En general, las propiedades ópticas de este tipo de nanopartículas dependen, principalmente, de su resonancia de plasmón superficial, originada por la oscilación colectiva de los electrones libres presentes en la superficie de las mismas, los cuales interaccionan con la radiación ultravioleta [53].

Las nanopartículas metálicas, absorben radiación óptica a la longitud de onda correspondiente a la resonancia del plasmón de superficie, la cual puede variar en función de la forma y el tamaño de las partículas obtenidas durante la síntesis. Puede decirse entonces que el plasmón de superficie es una especie de huella digital que indica, inequívocamente, la presencia de nanopartículas en la muestra [53].

De este modo, las nanopartículas de metales como el oro, la plata, el cobre, el aluminio, el paladio o el platino, presentan, a menudo, disoluciones coloidales de colores intensos cuyas frecuencias de resonancia de plasmón aparecen en el rango de longitud de onda de la región visible y que dependen de la forma y el tamaño de las mismas.

La disolución de AgNPs sintetizadas según el método seleccionado, se caracterizó midiendo la absorbancia de la dispersión resultante en la región

visible del espectro. La aparición de un pico de absorción en el rango de longitudes de onda correspondiente al color de la disolución obtenida confirmaría la obtención de las nanopartículas.

El espectro de absorción ultravioleta-visible de la dispersión coloidal (Figura 4.4), se registró mediante un espectrofotómetro de absorción ultravioleta-visible Thermo Spectronic Unicam UV 500 (Cambridge, Reino Unido) para un rango de longitudes de onda comprendido entre 200 nm y 600 nm. Los resultados obtenidos, mostraron la aparición de un pico de absorbancia en torno a los 390 nm que confirmaba que la formación de las AgNPs había tenido lugar. Por su parte, la posición exacta del pico dependía, en gran medida, del diámetro, de la forma y de la distribución de los tamaños de las mismas. En este caso, la simetría observada en el pico indicaba que se habían formado AgNPs dispersas, de la misma forma y tamaño y sin la aparición de agregados.

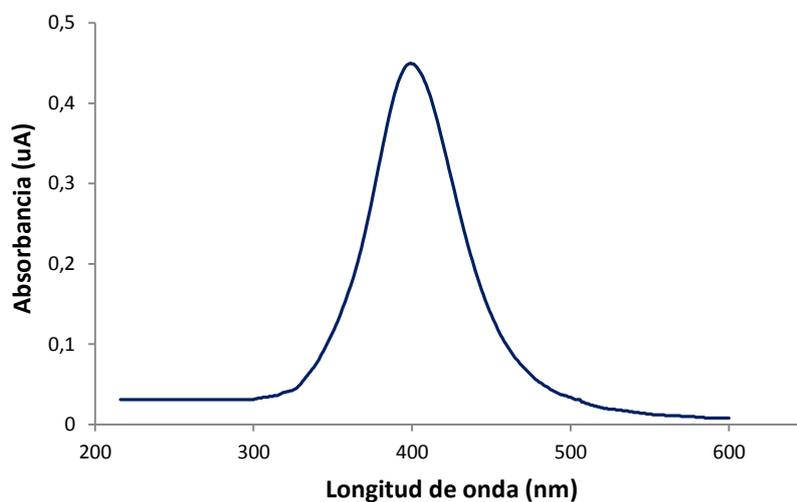


Figura 4.4. Espectro de absorción UV-visible de la dispersión de nanopartículas de plata.

4.3.2.2. Caracterización por microscopía de transmisión electrónica (TEM)

La microscopía de transmisión electrónica (TEM), es una técnica en la que se hace incidir un haz de electrones a través de una muestra para formar una imagen que permita la visualización de un objeto. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, habrá electrones que atraviesen la muestra directamente, mientras que otros serán totalmente desviados al impactar sobre la misma. El instrumento que se emplea para llevar a cabo las mediciones es un microscopio de transmisión electrónica, el cual permite realizar ampliaciones hasta 5100 veces más potentes que los mejores microscopios ópticos debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones de la luz visible. Como resultado, se obtiene es una imagen, con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento, con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes. Dicha imagen proporciona, además, información sobre la estructura de la muestra, tanto si es amorfa como cristalina.

Así pues, las propiedades ópticas de las AgNPs sintetizadas se evaluaron por espectroscopía UV-visible, mientras que la forma, el tamaño medio de partícula y la distribución de tamaños se determinó por espectroscopía de transmisión electrónica (TEM). El análisis se realizó con un microscopio de transmisión electrónica modelo Philips CM 200, que opera a un voltaje de 200 kv, del Servicio de Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Para ello, la muestra se depositó en una rejilla de cobre recubierta con una

película de carbono y se dejó secar a temperatura ambiente y en oscuridad hasta la completa evaporación del disolvente.

En la Figura 4.5, se recogen las imágenes obtenidas por TEM para la correspondiente disolución de nanopartículas de plata. En ambos casos se observa que, como cabía esperar, las AgNPs constituyentes de la dispersión coloidal presentaban forma esférica y que se encontraban lo suficientemente dispersas como para no formar agregados. Así mismo, el correspondiente análisis de imagen, dio como resultado un tamaño de partícula comprendido entre los 4 y los 13 nm.

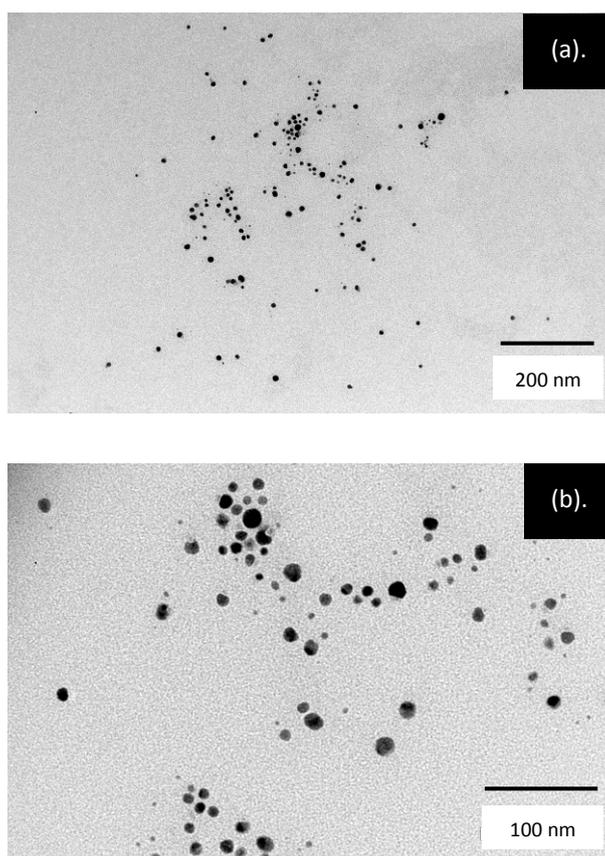


Figura 4.5. Imágenes TEM de las AgNPs sintetizadas utilizando NaBH_4 como agente reductor.

4.4. MODIFICACIÓN DE LA MEMBRANA LÍQUIDA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Las nanopartículas de plata sintetizadas según el método descrito en el apartado 4.3.1, se utilizaron para evaluar cómo influye en la eficacia de la extracción la presencia de éstas en el disolvente orgánico que se utiliza como membrana líquida en los procedimientos de EME.

4.4.1. Dispositivo experimental y procedimiento de extracción

La extracción mediante electromembrana empleando membranas líquidas modificadas con nanopartículas de plata, se llevó a cabo, inicialmente, utilizando el mismo dispositivo y procedimiento experimental descritos en el apartado 2.2 de esta Memoria. Como analitos modelo se seleccionaron, nuevamente, los cinco antiinflamatorios no esteroideos objeto de estudio (SAL, KTP, NAX, DIC e IBU).

Así mismo, se utilizaron las mismas condiciones de extracción previamente optimizadas con este dispositivo para, posteriormente, evaluar si la modificación de la membrana líquida con AgNPs permitía mejorar los resultados obtenidos en ausencia de las mismas, lo que supondría un aumento en la sensibilidad del método. De este modo, se aplicó una diferencia de potencial de 60 voltios durante 20 minutos a 25 mL de una disolución (pH 7; KOH) de concentración $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ que se agitó continuamente a una velocidad de 600 rpm. Los compuestos se extrajeron en un volumen de fase aceptora de 50 μL (pH 12; NaOH 10 mM) utilizando 1-octanol modificado con nanopartículas de plata como membrana líquida soportada.

Al igual que en todos los procedimientos ya descritos, la intensidad de corriente generada durante la extracción se registró (un dato cada 0.5 segundos) conectando en serie al sistema un multímetro digital (Peack Tech® model 3430, Ahrensburg, Alemania) que, a su vez, se conectaba a un ordenador.

4.4.2. Uso de membranas líquidas modificadas con nanopartículas de plata en sistemas de extracción mediante electromembrana

Siguiendo el mismo criterio que en capítulos anteriores para la selección de la membrana líquida, el disolvente orgánico utilizado durante todo el estudio fue 1-octanol, dado que es el que ofrece los mejores resultados para la extracción electrocinética de los compuestos seleccionados. Actualmente, no se conoce ningún mecanismo que permita la síntesis directa de AgNPs en 1-octanol o en algún disolvente de características similares a éste. Por esta razón, fue necesario sintetizarlas en medio acuoso, en primer lugar, para, posteriormente, aplicar alguna estrategia que permitiera transferirlas al medio orgánico de interés.

De este modo, una vez seleccionado el procedimiento óptimo para la síntesis de las nanopartículas de plata (descrito en el apartado 4.3.1), se ensayaron distintas formas para transferirlas al 1-octanol. El éxito o el fracaso de dicha meta dependía, en gran medida, de que la forma en la que se realizase dicha transferencia permitiera conseguir una distribución homogénea y uniforme de las nanopartículas en la membrana líquida. Así pues, la modificación de la SLM se planteó desde dos puntos de vista diferentes. Por un lado, se propone la dispersión directa de la disolución acuosa de AgNPs en 1-octanol mediante agitación mecánica y, por otro, la

transferencia directa de las AgNPs a este mismo disolvente desde el medio acuoso en el que se sintetizan.

A continuación, se describe el procedimiento empleado en cada una de las estrategias que se proponen para la modificación de 1-octanol con las nanopartículas de plata así como los resultados obtenidos tras su uso como membrana líquida soportada.

4.4.2.1. Dispersión por agitación mecánica

Los primeros ensayos consistieron en dopar el 1-octanol con pequeños volúmenes (del orden de los microlitros) de la disolución acuosa de AgNPs. Mediante la agitación mecánica de la mezcla resultante, se conseguía que la fase acuosa se dispersase en la fase orgánica, quedando la primera suspendida en la segunda en forma de pequeñas gotas homogéneamente distribuidas. De este modo, cuando la fibra se sumergía en esta dispersión, se impregnaba tanto con el disolvente orgánico como con las AgNPs allí presentes. Las dispersiones así obtenidas eran estables durante al menos 24 horas.

Siguiendo este sencillo procedimiento, se prepararon un total de cinco dispersiones constituidas por 5 mL de 1-octanol a los que se añadieron, respectivamente, 1, 5, 10, 50 y 100 μ L de la disolución de AgNPs para su posterior uso como membrana líquida en la extracción mediante electromembrana de los compuestos seleccionados.

En la Tabla 4.2 y en la Figura 4.6, se recogen los factores de enriquecimientos obtenidos con cada una de las mezclas de 1-octanol dopado con AgNPs así como sus correspondientes desviaciones estándar.

Tabla 4.2. Factores de enriquecimiento obtenidos con las distintas dispersiones de AgNPs en 1-octanol.

| Volumen AgNPs (μL) | Factor de enriquecimiento ^a | | | | |
|---------------------------------|--|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | SAL | KTP | NAX | DIC | IBU |
| 0 (1-octanol puro) | 134.3 \pm 6.7 | 121.9 \pm 4.1 | 106.1 \pm 7.9 | 85.6 \pm 3.7 | 115.9 \pm 6.7 |
| 1 | 129.5 \pm 2.9 | 128.5 \pm 4.3 | 102.3 \pm 2.9 | 88.1 \pm 3.4 | 125.1 \pm 1.9 |
| 5 | 94.5 \pm 0.7 | 94.5 \pm 0.7 | 98.2 \pm 4.3 | 92.5 \pm 3.7 | 103.3 \pm 1.1 |
| 10 | 85.9 \pm 2.5 | 53.1 \pm 1.5 | 93.6 \pm 3.2 | 54.9 \pm 6.7 | 101.1 \pm 4.6 |
| 50 | 29.2 \pm 0.6 | 30.5 \pm 1.4 | 23.2 \pm 0.9 | 22.1 \pm 1.7 | 27.1 \pm 0.8 |
| 100 | 19.2 \pm 0.1 | 18.3 \pm 0.2 | 16.6 \pm 0.2 | 14.9 \pm 0.8 | 20.5 \pm 1.0 |

^aMedia de tres determinaciones \pm desviación estándar (% RSD < 18 %)

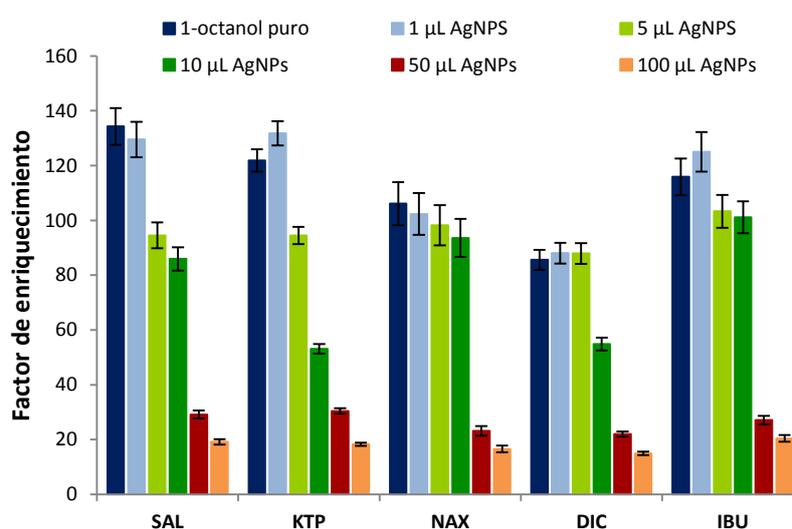


Figura 4.6. Factores de enriquecimiento para las dispersiones de AgNPs en 1-octanol.

Según los resultados obtenidos, en presencia de 1 μL de AgNPs los factores de enriquecimiento eran prácticamente los mismos que los que se obtenían con 1-octanol puro. Sin embargo cantidades superiores a 5 μL de AgNPs producían cambios drásticos en los factores de enriquecimiento de SAL y KTP, no siendo así para el resto de compuestos, para los que dichos cambios se apreciaban cuando se añadían volúmenes superiores a 50 μL de AgNPs.

Para algunos compuestos, como KTP o IBU, en presencia de 1 μL de AgNPs, se apreciaba un ligero aumento en los factores de enriquecimiento. Sin embargo, estos resultados eran apenas un 8% superiores a los que se obtenían en ausencia de AgNPs, por lo que, si se tiene en cuenta que las desviaciones estándar relativas en los procesos de EME alcanzan valores de entre el 10 y el 15%, se puede considerar que no había diferencias significativas entre los resultados obtenidos.

Por otra parte, al considerar los resultados de forma global, se observaba que existía, claramente, una tendencia general por la cual los factores de enriquecimiento disminuían progresivamente a medida que aumentaba el volumen de AgNPs que se dispersaba en la SLM. Dicha disminución, era especialmente evidente para todos los compuestos cuando el volumen de AgNPs es igual o superior a 50 μL .

Por lo tanto, a partir de los resultados de este estudio, se concluyó que la dispersión de AgNPs en la membrana líquida (1-octanol) no producía ninguna mejora significativa en la eficacia de la extracción.

4.4.2.2. Transferencia directa de las nanopartículas de plata a la membrana líquida soportada

En segundo lugar, se planteó un estudio que implicaba la modificación directa del 1-octanol utilizando las nanopartículas de plata como aditivo para mejorar la transferencia de masa. De este modo, se pretendía dispersar homogéneamente las AgNPs en el disolvente orgánico para su posterior uso como SLM en la extracción mediante electromembrana de los compuestos de interés. La inclusión de dichas nanopartículas en la SLM, tenía como objetivo aprovechar la conductividad eléctrica de las mismas para incrementar el campo eléctrico que se genera al aplicar una diferencia de potencial, lo cual, según el modelo matemático teórico basado en la ecuación de Nernst-Planck, favorecería la migración electrocinética de los analitos desde la fase donadora hasta la aceptora a través de la membrana líquida.

Ahora bien, dado que no se conoce ningún método que permita la síntesis directa de AgNPs en un disolvente orgánico como el 1-octanol o, en su defecto, transferirlas a éste directamente desde su medio acuoso de síntesis, fue necesaria la búsqueda de un procedimiento que permitiera la consecución de este objetivo inicial.

En ese sentido, este estudio se dividió en dos partes que comprenden:

a. La transferencia de las AgNPs desde el medio acuoso en el que se sintetizan al disolvente orgánico se emplea como membrana líquida soportada (1-octanol).

b. El uso del disolvente orgánico así modificado en la extracción electrocinética de los AINEs analizados para evaluar la eficacia de la extracción en presencia de este tipo de nanomateriales.

A continuación se describen los procedimientos ensayados para la transferencia de las nanopartículas de plata al 1-octanol.

A. Primer procedimiento

Como se comentó en la introducción de este capítulo, algunos autores han conseguido mejorar la eficacia de la extracción mediante la adición directa de nanomateriales funcionales sólidos en la membrana líquida [5-11]. En este sentido, tomando como referencia algunos de estos trabajos, se consideró la posibilidad de obtener AgNPs sólidas para, posteriormente, dispersarlas en el disolvente orgánico.

La obtención de AgNPs sólidas a partir de la suspensión coloidal acuosa y su posterior dispersión en 1-octanol, se realizó de dos formas: mediante liofilización y mediante centrifugación.

En el primer caso, se eliminó el disolvente acuoso por liofilización de la disolución acuosa de nanopartículas de plata. Como resultado se obtuvieron AgNPs en forma de sólido seco pulverizado. Posteriormente, las nanopartículas se añadieron al disolvente orgánico y la mezcla resultante se sometió a agitación en baño de ultrasonidos durante 20 minutos para favorecer la dispersión del sólido. No obstante, tras varios ciclos de agitación no se consiguieron los resultados esperados ya que las AgNPs no permanecían en suspensión en la fase orgánica sino que volvían a precipitar una vez finalizada la agitación.

En el segundo caso, las nanopartículas sólidas se recuperaron mediante un procedimiento de centrifugación similar al descrito por A.P. Kulkarni, et al. [55], en el que las AgNPs sintetizadas por reducción química, se transfieren a distintos disolventes orgánicos tanto de naturaleza polar como apolar. Para ello, la disolución se centrifugó a 9000 rpm durante 30 minutos, tras lo cual se observó que parte de las AgNPs se habían separado de la disolución por sedimentación. Las AgNPs sedimentadas se separaron del sobrenadante, que se centrifugó dos veces más hasta su completa decoloración ya que la ausencia de color en la disolución, era indicativo de que todas las nanopartículas allí presentes habían precipitado. Los sedimentos obtenidos tras cada ciclo de centrifugación, se agruparon y se llevaron a sequedad en estufa de vacío. Tras la completa evaporación del disolvente, se obtuvo un sólido seco pulverizado que se intentó dispersar en la membrana líquida. No obstante, al igual que ocurría en el procedimiento anterior, no se consiguió la dispersión de las AgNPs sólidas en el 1-octanol, ya que éstas precipitaban inmediatamente tras cesar la agitación de la mezcla en baño de ultrasonidos.

B. Segundo procedimiento

En segundo lugar, se probó a transferir las nanopartículas de plata al disolvente orgánico mediante un procedimiento muy simple, similar a una extracción líquido-líquido. Para ello, se mezclaron volúmenes iguales de la disolución de AgNPs y de 1-octanol y se agitaron utilizando un agitador rotatorio. Como resultado, se formó una emulsión en la que ambas fases se permanecían en contacto continuo mediante la agitación constante y homogénea de la mezcla, la cual se mantuvo en agitación hasta la pérdida de color de la fase acuosa (aproximadamente 3 horas).

Finalizada la agitación y, tras un tiempo de reposo, se observó la aparición de tres fases: una fase acuosa incolora, una interfase ligeramente coloreada y una fase orgánica también incolora. Para comprobar si, efectivamente, las AgNPs se habían transferido desde la fase acuosa a la orgánica, se registraron sus correspondientes espectros de absorción. En ninguno de los espectros se observó ningún tipo de señal. Esto último indicaba, por un lado, que las AgNPs ya no estaban en la fase acuosa de ahí la ausencia de color en la misma y, por otro, que tampoco se habían transferido a la fase orgánica por lo que necesariamente debían encontrarse en la interfase coloreada.

Ante la posibilidad de que las AgNPs no pasasen a la fase orgánica porque el volumen de disolvente orgánico empleado fuese insuficiente para lograr la dispersión de las mismas, se incrementó la relación de volúmenes entre ambas fases. De este modo, se prepararon mezclas en las que el volumen de 1-octanol duplicaba (1:2) y triplicaba (1:3) al de la fase acuosa, y se aplicó el mismo procedimiento para transferirlas al medio orgánico. En ambos casos, los resultados fueron idénticos a los obtenidos al mezclar volúmenes iguales de las dos fases. Este comportamiento parecía indicar que la continua agitación de la mezcla provocaba que las AgNPs se agregasen, tras lo cual no podían volver a dispersarse en ninguna de las dos fases y, como resultado, permanecían en la interfase.

Por lo tanto, este procedimiento tampoco resultó ser adecuado para transferir las AgNPs a la membrana líquida.

C. Tercer procedimiento

La transferencia de las AgNPs al medio orgánico se consiguió, finalmente, mediante la adaptación de un procedimiento similar a una extracción líquido-líquido propuesto por X. Feng et al. [56], para la transferencia de nanopartículas de oro, plata y platino desde un medio acuoso a un disolvente orgánico. La elección de este método se debió, fundamentalmente, a que las AgNPs se transfieren a 1-butanol, disolvente que pertenece a la misma serie alcoholes orgánicos que el 1-octanol.

Según lo descrito por los autores, la transferencia se lleva a cabo de la siguiente forma:

Se añaden, sobre 30 mL de la disolución de nanopartículas, 20 mL de 1-butanol. La mezcla se agita con ayuda de un agitador magnético a temperatura ambiente, de forma que, al cesar la agitación, ambas fases se separan sin que se haya producido transferencia alguna puesto que la fase acuosa mantiene su color amarillo característico. Seguidamente, la mezcla se agita y se calienta gradualmente hasta 80°C en un baño de agua. Al alcanzar dicha temperatura, se para la agitación y se mantiene la mezcla en el baño durante 5 minutos, tras lo cual ambas fases se separan espontáneamente quedando la fase orgánica coloreada y la fase acuosa totalmente incolora. Este hecho, pone de manifiesto el paso de las nanopartículas al disolvente orgánico. (¿Se deja en presente?)

Este mismo procedimiento, así descrito, se aplicó para la transferencia de las AgNPs sintetizadas según el método seleccionado para este estudio y sustituyendo el 1-butanol por 1-octanol. Este último,

además, se añadió gota a gota sobre la disolución acuosa de AgNPs en lugar de añadir directamente sobre ésta los 20 mL de 1-octanol. Transcurridos los 5 minutos en los que la mezcla permanece en el baño de agua a 80°C, se observó que ambas fases quedaban separadas por una interfase en la que se había formado una emulsión que no desaparecía. Para eliminar las emulsiones que se generan cuando se transfieren nanopartículas de un medio acuoso a un medio orgánico, algunos autores describen el uso de HCl [57,58]. Así, para eliminar la emulsión formada entre ambas fases, se añadieron, manteniéndola en agitación, 500 µL de HCl 0.25 M a la mezcla, tras lo cual se obtuvieron una fase acuosa y una fase orgánica incoloras separadas por una interfase de color grisáceo.

4.4.2.3. Caracterización de la dispersión de nanopartículas de plata en 1-octanol

Para comprobar la presencia de las AgNPs en el disolvente orgánico, las fases acuosa y orgánica implicadas en el proceso de transferencia se caracterizaron, en primer lugar, por espectroscopía de absorción ultravioleta-visible. En la Figura 4.7 se recogen los espectros de absorción molecular de cada una de las fases después de la transferencia de las nanopartículas a 1-octanol.

Mientras que en el espectro correspondiente a la fase acuosa no se apreciaba ningún tipo de señal (Figura 4.7 (a).), el espectro de la fase orgánica (Figura 4.7 (b).) mostró un pico de absorbancia a una longitud de onda de 240 nm, lo cual confirmaba que las AgNPs, efectivamente, se habían transferido al 1-octanol. Por su parte, la coloración que se apreciaba

en la interfase podría deberse a la formación agregados de nanopartículas que quedaban retenidas en la misma y no pasaban a la fase orgánica.

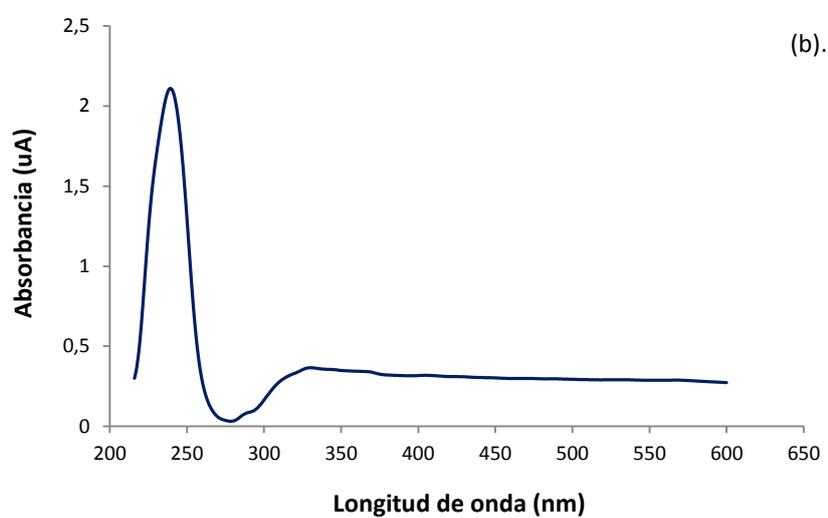
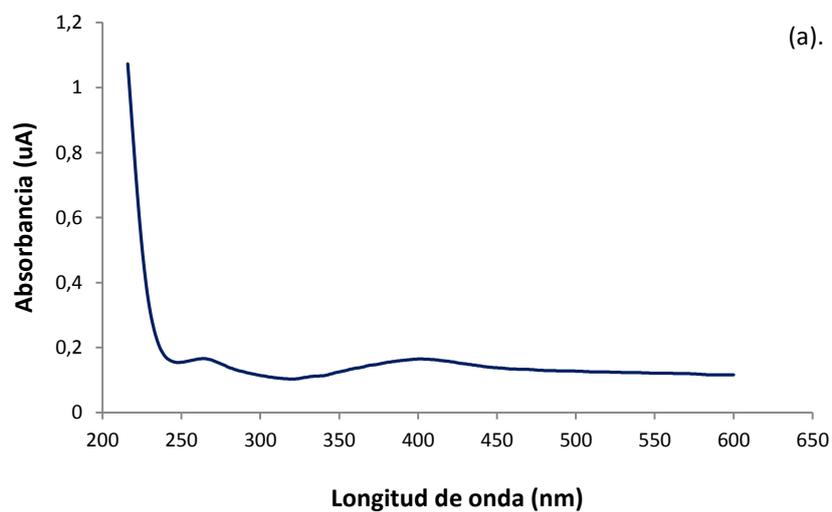


Figura 4.7. Espectros de absorción molecular correspondientes a las fases (a). acuosa y (b). orgánica después de la transferencia de las AgNPs a 1-octanol.

Al tener en cuenta, además, el espectro de absorción de la dispersión acuosa de AgNPs (Figura 4.4), se observaba que el pico de absorbancia se desplazaba desde la región visible del espectro electromagnético (390 nm) cuando se encontraban en medio acuoso, hasta la región ultravioleta (240 nm) cuando se encontraban en 1-octanol. Es decir, se producía un desplazamiento de tipo hipsocrómico ya que cuando se transfieren al disolvente orgánico, las AgNPs pasan a absorber radiación a una longitud de onda más baja. Esta longitud de onda, además, pertenece a la región del ultravioleta, lo cual explicaría la ausencia de color al pasar del medio acuoso al medio orgánico. No obstante, al ser el 1-octanol menos polar que el agua, el pico de absorción debería presentar un desplazamiento batocrómico o hacia longitudes de ondas más altas, ya que los desplazamientos hipsocrómicos se producen, normalmente, al aumentar la polaridad del disolvente. Pese a que la caracterización de las dispersiones de AgNPs en 1-octanol por espectroscopía de absorción molecular corroboraba la presencia de éstas en el disolvente orgánico, no se dispone de ninguna explicación para este comportamiento.

La presencia de las AgNPs en 1-octanol, se confirmó también mediante la caracterización del disolvente modificado por microscopía de transmisión electrónica (TEM). La Figura 4.8, muestra la imagen de TEM correspondiente a la dispersión de AgNPs en 1-octanol obtenida según el procedimiento de transferencia anteriormente descrito. Como se observa, al pasar al medio orgánico las AgNPs conservaban su forma esférica inicial, encontrándose, además bien dispersas y sin formar aglomerados. No obstante, su tamaño promedio, comprendido entre los 20 y los 30 nm, era unas dos veces mayor al que presentaban en el medio acuoso en el que se sintetizan.

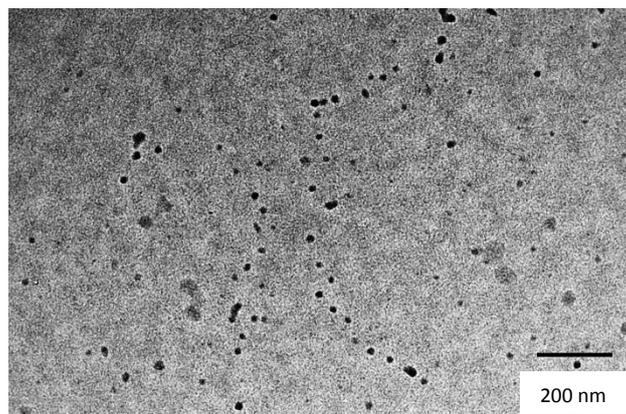


Figura 4.8. Imagen de la dispersión de AgNPs en 1-octanol obtenida por TEM.

4.4.2.4. Modificación del método de transferencia de nanopartículas de plata

Dado que el método propuesto dio resultados positivos en cuanto a la transferencia de las nanopartículas al disolvente orgánico, el siguiente paso fue evaluar si la concentración de éstas en el mismo dependía de la relación entre los volúmenes de las fases acuosa y orgánica. Así, además de la relación de volúmenes fase acuosa-fase orgánica (3:2) propuesta por los autores del método de transferencia seguido, se ensayaron otras tres en las que el volumen de disolvente orgánico se mantuvo constante, mientras que el de fase acuosa se fue incrementando. Las relaciones de volúmenes fase acuosa-fase orgánica empleadas fueron (1:1), (2:1) y (3:1). La finalidad de fijar el volumen de disolvente orgánico y aumentar el de la fase acuosa, era conseguir una fase orgánica lo más concentrada posible en AgNPs.

No obstante, los resultados obtenidos al emplear diferentes volúmenes de la disolución de AgNPs, no diferían mucho entre sí, observándose absorbancias similares para la fase orgánica en todos los

casos. Así mismo, se comprobó que cuanto mayor era el volumen de la fase acuosa respecto al de la orgánica, mayor era el tamaño de los agregados de AgNPs que se formaban en la interfase. Esto último parece indicar que la cantidad de nanopartículas que pasaban a la fase orgánica dependía únicamente del coeficiente de reparto de las mismas entre ambas fases, independientemente de que el volumen de fase acuosa que se pusiese en contacto con la fase orgánica fuese mayor o menor.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se seleccionó una relación de volúmenes (1:1) para el resto de los estudios.

Una vez establecido el método de transferencia, se analizó si la introducción de ligeras modificaciones en el procedimiento afectaba a la forma, tamaño y/o distribución de las AgNPs o, si por el contrario se obtenían siempre los mismos resultados. A partir del procedimiento anteriormente descrito, se realizaron una serie de transferencias adicionales incluyendo las modificaciones que se indican a continuación:

a. *Dispersión 1*: Método original con una relación de volúmenes (1:1).

b. *Dispersión 2*: El baño de agua se calienta a 80°C. Una vez alcanzada dicha temperatura, se introduce la mezcla bifásica formada por la fase acuosa con las AgNPs y el 1-octanol, y se mantiene en el mismo durante cinco minutos con agitación constante.

c. *Dispersión 3*: Se sigue el método habitual pero se añade NaOH 0.25 M en vez de HCl 0.25 M para eliminar la emulsión que se forma en la interfase.

d. *Dispersión 4*: Se sigue el método habitual pero no se añade ni HCl ni NaOH una vez que las fases se separan de forma que no se elimina la emulsión de la interfase.

e. *Dispersión 5*: Se mezcla, desde el inicio del proceso, todo el volumen de 1-octanol con el de la disolución de AgNPs en lugar de añadirlo gota a gota.

Las dispersiones de AgNPs en 1-octanol así obtenidas, se caracterizaron mediante espectroscopía de absorción ultravioleta visible (UV-vis) y por microscopía de transmisión electrónica (TEM).

La siguiente tabla (Tabla 4.3), recoge las longitudes de onda a la que aparecen los máximos de absorción del 1-octanol modificado así como sus correspondientes valores de absorbancia.

Tabla 4.3. Valores de longitud de onda y absorbancia del máximo de absorción de las dispersiones de AgNPs en 1-octanol.

| Dispersión | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| λ (nm) | 239 | 248 | 226 | 229 | 259 |
| Absorbancia (u.A.) | 2.110 | 1.184 | 1.830 | 1.584 | 1.258 |

Como puede observarse, existen ligeras diferencias en la longitud de onda a la que aparece el máximo de absorción con cada una de las dispersiones, aunque en todos los casos, esas longitudes de onda pertenecen a la región del ultravioleta. Estas diferencias también se ponen de manifiesto en los valores de absorbancia obtenidos en cada caso, lo cual parece indicar que las modificaciones realizadas en el procedimiento de

transferencia afectan a la forma, tamaño y/o distribución de las AgNPs. Para corroborar esto último, todas las dispersiones se caracterizaron, además, por microscopía de transmisión electrónica. La Figura 4.9 muestra las imágenes de TEM para cada una de ellas.

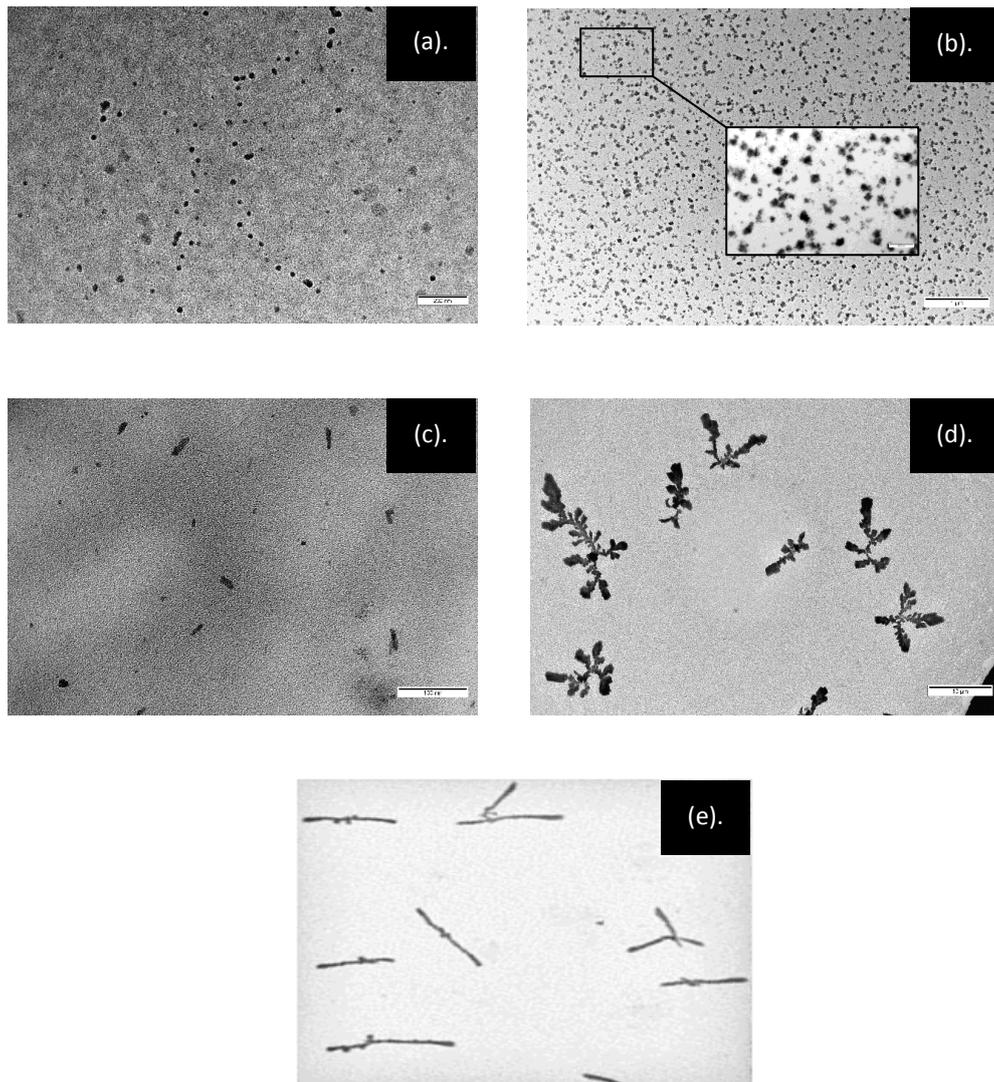


Figura 4.9. Imágenes obtenidas por TEM, correspondientes a las distintas dispersiones de AgNPs en 1-octanol. (a). Dispersión 1, (b). Dispersión 2, (c). Dispersión 3, (d). Dispersión 4 y (e). Dispersión 5.

Como ya se verificó en el apartado anterior, con el método 1, que corresponde al descrito por X. Feng et al. [56], se obtiene una dispersión de AgNPs esféricas, con un diámetro de partícula entre dos y tres veces mayor al que resulta tras la síntesis en medio acuoso (entre 20 y 30 nm aproximadamente). Por otro lado, con el método 2 las AgNPs se encuentran formando pequeños agregados con forma estrellada y con un tamaño regular aunque de mayores dimensiones, aproximadamente unos 80 nm. En el caso del método 3, se observa que las AgNPs se encuentran mucho más dispersas que en los dos métodos anteriores y que tienen formas irregulares. Pese a ello, se aprecia que predominan las que tienen forma de varas, con un tamaño de partícula que varía entre los 30 y los 40 nm. Por su parte, las imágenes correspondientes a los métodos 4 y 5 muestran claramente que las AgNPs se encuentran formando aglomerados de mayor tamaño (del orden de los micrómetros) aunque, en ambos casos, tienen formas regulares y bien definidas. En el primer caso, los aglomerados tienen un tamaño de 10 μm y presentan una estructura ramificada, similar a la de los dendrímeros, mientras que los aglomerados que resultan según el método 5 tienen forma de bastones, con tamaños variables entre los 20 y los 25 μm .

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos tras caracterizar las dispersiones de AgNPs en 1-octanol, resulta evidente que las modificaciones introducidas en el procedimiento de transferencia influyen en la forma y la distribución que presentan en el disolvente orgánico.

Posteriormente, estas dispersiones, incluyendo las dos en las que las AgNPs se presentan en forma de agregados micrométricos, se utilizaron

como membrana líquida para la extracción electrocinética de los AINEs seleccionados. La Tabla 4.4 y la Figura 4.10, muestran los resultados obtenidos con cada una de las mezclas ensayadas así como sus correspondientes desviaciones estándar.

Tabla 4.4. Factores de enriquecimiento obtenidos con cada una de las dispersiones de AgNPs en 1-octanol.

| SLM | Factor de enriquecimiento ^a | | | | |
|---------------------|--|-------------|-------------|------------|-------------|
| | SAL | KTP | NAX | DIC | IBU |
| 1-Octanol | 134.3 ± 6.7 | 121.9 ± 4.1 | 106.1 ± 7.9 | 85.6 ± 3.7 | 115.9 ± 6.7 |
| Dispersión 1 | 140.4 ± 0.9 | 124.1 ± 2.7 | 95.7 ± 0.2 | 75.7 ± 7.3 | 106.9 ± 1.4 |
| Dispersión 2 | 118.9 ± 1.2 | 102.5 ± 3.0 | 88.2 ± 0.2 | 65.2 ± 5.9 | 98.8 ± 3.8 |
| Dispersión 3 | 145.3 ± 2.7 | 116.9 ± 3.8 | 88.1 ± 2.3 | 62.1 ± 0.6 | 98.6 ± 3.2 |
| Dispersión 4 | 126.5 ± 3.3 | 110.6 ± 1.8 | 89.4 ± 0.1 | 67.6 ± 0.7 | 103.1 ± 0.8 |
| Dispersión 5 | 134.6 ± 3.9 | 120.2 ± 6.0 | 91.4 ± 3.1 | 68.1 ± 2.1 | 107.5 ± 4.7 |

^aMedia de tres determinaciones ± desviación estándar (% RSD < 18 %)

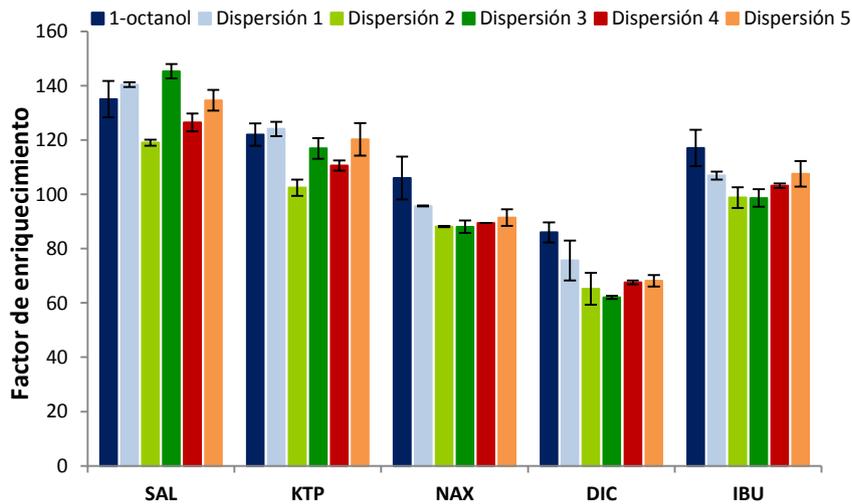


Figura 4.10. Factores de enriquecimiento obtenidos tras emplear las dispersiones de AgNPs en 1-octanol como SLM.

Como se aprecia, los peores resultados se obtuvieron con la dispersión 2 para todos los compuestos, mientras que la dispersión 1 era la que proporcionaba los mejores resultados para todos salvo para SAL. Para éste, los mejores resultados se alcanzaron con la dispersión 3, aunque no diferían significativamente respecto de los que proporcionaba la dispersión 1. Por su parte, para NAX, DIC e IBU, los resultados fueron bastante similares con todas las dispersiones, mientras que para SAL y KTP se apreciaba una cierta variabilidad ya que, para estos compuestos, con las dispersiones 1,3 y 5 se alcanzaron resultados ligeramente mejores que con la 2 y la 4. No obstante, la diferencia entre los factores de enriquecimiento obtenidos con 1-octanol y las dispersiones 1, 3 y 5 no era lo suficientemente significativa como para considerarla una mejora, puesto que dicha diferencia se encontraba dentro del error que lleva asociado la propia técnica de extracción electrocinética.

Así pues, la tendencia general observada, salvo para las excepciones ya comentadas, indica que la eficacia de la extracción al emplear 1-octanol modificado con AgNPs no variaba o disminuía respecto de la que se obtenía con el disolvente puro.

Teniendo en cuenta que el espesor de la doble capa eléctrica que se forma alrededor de la SLM al aplicar una diferencia de potencial depende del grado en el que se acumulan alrededor de ésta las especies iónicas presentes en las fases donadora y aceptora, puede concluirse que, independientemente de la concentración, la forma, el tamaño y la distribución de las AgNPs, la presencia de éstas en la membrana líquida no producía ninguna mejora en la eficacia de la extracción.

Ahora bien, si se representa gráficamente la variación de la intensidad de corriente en función del tiempo que dura la extracción (Figura 4.11), puede verse que cuando se empleaba 1-octanol modificado con AgNPs dicha intensidad era mayor al comienzo del proceso. Aunque intensidades de corriente elevadas conducen a sistemas inestables, el aumento generado por la presencia de AgNPs en la SLM no comprometía la estabilidad del sistema. Según la ley de Ohm (Ecuación 1), en condiciones de voltaje constante, al aumentar la intensidad, la resistencia al transporte de materia disminuye, por lo que debería producirse un aumento de la migración electrocinética que en la práctica parece no ocurrir. Este comportamiento parece indicar que lo que realmente se acentúa es la resistencia al transporte iónico, lo cual debe tener su origen en alguna de las tres fases que componen el sistema puesto que la resistencia que ejerce el propio soporte es siempre constante.

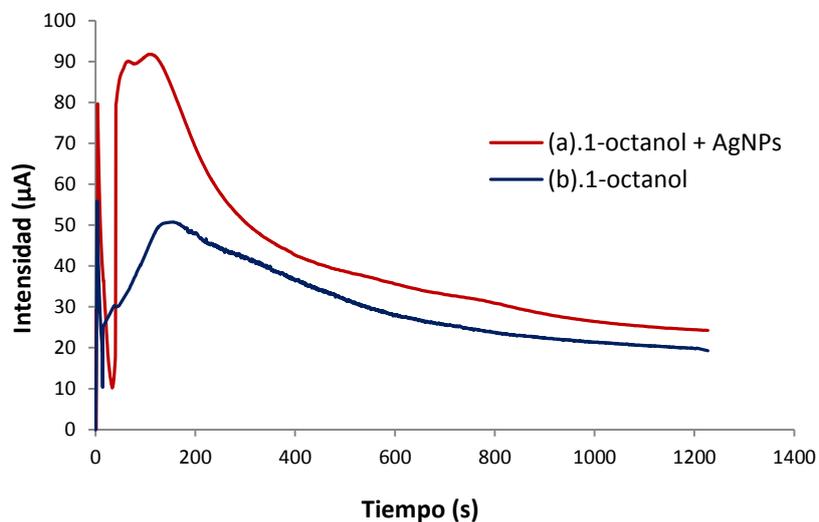


Figura 4.11. Tendencia de la intensidad de corriente registrada cuando se emplean (a). 1-octanol modificado con AgNPs y (b). 1-octanol como SLM.

$$I = \frac{V}{R} \quad (\text{Ecuación 1})$$

dónde:

I es la intensidad de corriente

V es la diferencia de potencial

R es la resistencia

Para evaluar si la presencia de AgNPs en la SLM provocaba un aumento de la resistencia al transporte de materia, se utilizaron todas las dispersiones de AgNPs en 1-octanol en sistemas de extracción mediante micro-electromembrana (μ -EME), los cuales eliminan el uso de soportes físicos para el disolvente orgánico y, en su lugar, emplean membranas líquidas libres (FLM). Este estudio, se realizó durante una estancia predoctoral de tres meses en el Grupo de Investigación “*Electromigration Methods*” perteneciente al “*Instituto de Química Analítica de la Academia de Ciencias Checa*”, en Brno, República Checa. La supervisión del estudio estuvo a cargo del director del grupo, el Dr. Pavel Kubáň, responsable del desarrollo de los sistemas de μ -EME.

4.5. USO DE MEMBRANAS LÍQUIDAS MODIFICADAS CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN SISTEMAS DE EXTRACCIÓN MEDIANTE MICRO-ELECTROMEMBRANA (μ -EME)

4.5.1. Dispositivo experimental y procedimiento de extracción

El dispositivo experimental que se utilizó para llevar a cabo el procedimiento de extracción mediante micro-electromembrana (μ -EME) se representa en la Figura 4.12.

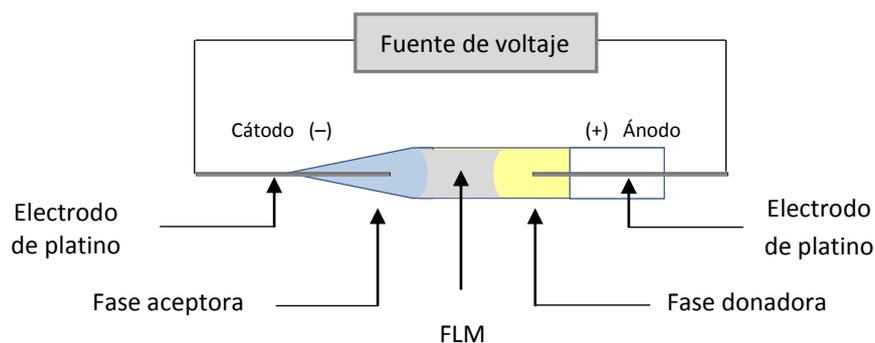


Figura 4.12. Esquema del dispositivo experimental para la μ -EME utilizando membranas líquidas libres.

El sistema estaba formado por una punta de micropipeta transparente y de polipropileno, con capacidad de 0.5-10 μL (Kartell, Noviglio, Italia), la cual constituía la unidad de extracción y se desecha tras cada uso. La punta se cortaba para obtener un segmento de 30 mm de longitud y, con la ayuda de una micropipeta (0.1-3 μL y 2-20 μL , ProLine Plus, Biohit, Helsinki, Finlandia), se llenaba por el extremo más estrecho con 2 μL de cada una de las tres fases que componen el sistema según la siguiente secuencia: 2 μL fase donadora acuosa – 2 μL de disolvente orgánico (FLM) – 2 μL fase aceptora acuosa. De este modo, la fase aceptora quedaba en el extremo que terminaba en punta, lo que facilitaba su recogida tras la extracción para su posterior análisis.

Una vez llena, la unidad de extracción se fijaba en posición horizontal y los electrodos de platinos (0.25 mm de espesor, 99.95%, Advent, Oxford, Inglaterra) se introducían por los extremos abiertos de la misma, de forma que quedasen inmersos en su correspondiente fase acuosa pero sin llegar a tocar la membrana líquida libre. Al ser los compuestos de interés de naturaleza aniónica, el electrodo negativo (cátodo) se colocaba en la fase

donadora y el positivo (ánodo) en la fase aceptora. Finalmente, ambos electrodos se conectaban a una fuente de voltaje (ES 0300-0.45, Delta Electronika, Zierikzee, Países Bajos) y se aplicaba una diferencia de potencial para que se produjese la migración electrocinética.

Finalizada la extracción, se desconectaba la fuente, se recogían los 2 μL de fase aceptora y se transferían a un vial con microinserto para su posterior análisis por electroforesis capilar. El proceso se realizaba a temperatura ambiente y en ausencia de agitación. Así mismo, la intensidad de corriente se monitorizó utilizando un multímetro digital (UT71D, Uni-Trend Technology Ltd., Dongguan, China) conectado en serie al sistema anotando un dato cada diez segundos.

4.5.2. Separación electroforética

El análisis de los compuestos estudiados se realizó por electroforesis capilar (CE). Para ello se utilizó un sistema de electroforesis Agilent Technologies 7100 CE (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector ultravioleta visible de fila de diodos (UV-DAD). Las condiciones de separación y detección electroforéticas, se adaptaron de un trabajo previo publicado en el Grupo de Investigación en el que se desarrolla esta Tesis Doctoral [59] en el que se analizaron antiinflamatorios no esteroideos por electroforesis capilar. De este modo, la separación se efectuó a un voltaje constante de 25 Kv en un capilar de sílice fundida (Polymicro Technologies, Fénix, AZ, EEUU) de 50 cm de longitud y con un diámetro interno de 75 μm . La temperatura del capilar se fijó en 20°C. Como electrolito de fondo (BGE) se empleó una disolución tampón formada por ácido acético/acetato de sodio 30 mM al 25% (v/v) en acetonitrilo (ACN), con un pH aparente de 5.

Previamente a su uso, el capilar de sílice se acondicionó mediante un ciclo de lavado en el que se hacían pasar de forma sucesiva a través del mismo, NaOH 1 M (10 minutos), agua ultrapura o milli-Q (10 minutos) y el correspondiente tampón de separación (10 minutos). Una vez acondicionado, diariamente, se hacía una limpieza previa en la que se pasaban NaOH 50 mM (2 minutos), agua ultrapura (2 minutos) y el tampón de separación (3 minutos). Esta misma limpieza se repitió tras el análisis de entre 10 y 15 muestras.

La inyección de la muestra se realizaba por presión, aplicando 50 mbar durante 5 segundos, y la separación se completó en un total de 10 minutos. La Figura 4.13, muestra el electroferograma tipo, con sus correspondientes tiempos de migración, que se obtenía al separar una mezcla patrón de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de todos los AINEs seleccionados según el método de separación electroforética descrito. Las longitudes de onda seleccionadas para la detección de los compuestos fueron 224 nm para IBU, 230 nm para NAX y 214 nm para DIC, KTP y SAL.

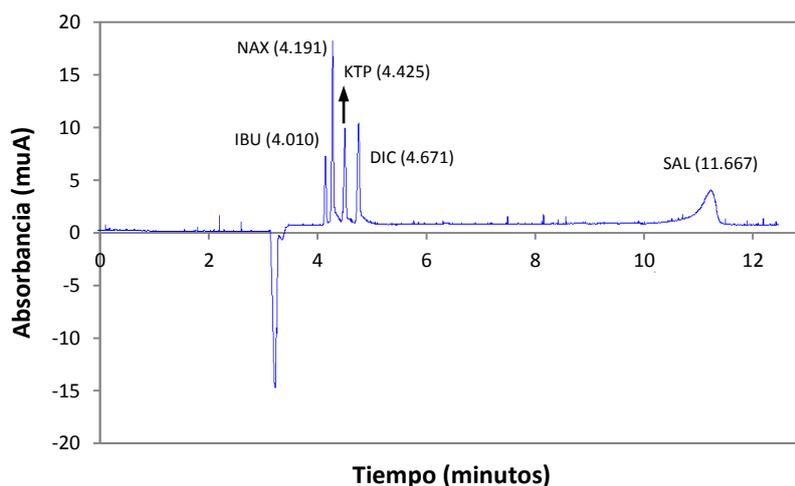


Figura 4.13. Electroferograma correspondiente a la separación electroforética de una mezcla patrón de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los AINEs estudiados.

4.5.3. Optimización de las condiciones operacionales

Tomando como referencia las condiciones óptimas para la EME de AINEs cuando se emplean fibras huecas como soporte para la SLM, se realizaron una serie de ensayos previos para fijar unas condiciones de extracción que permitieran la identificación y cuantificación de los compuestos utilizando 1-octanol como membrana líquida libre.

En primer lugar, se fijó el volumen de cada una de las tres fases implicadas en el proceso en 2 μL . De este modo, las bandas de disolvente que se formaban en la unidad de extracción eran lo suficientemente anchas como para que quedasen bien separadas y diferenciadas para que la migración ocurriera sin que se acumulasen iones en torno a las interfases entre la FLM y las correspondientes fases acuosas. Si se empleasen volúmenes mayores a 2 μL , se formarían bandas muy anchas y se necesitarían tiempos más largos para conseguir la migración de los analitos de una fase a otra ya que tendrían que recorrer distancias más largas.

Volúmenes tan pequeños de fase donadora y fase aceptora como los que se emplean en este tipo de técnica, junto con la ausencia de agitación, permiten aplicar voltajes más elevados que los que se suelen utilizar para la extracción de AINEs en dispositivos con soportes físicos para la membrana líquida. En los sistemas de μ -EME, se considera que la extracción se realiza satisfactoriamente cuando la intensidad de corriente se encuentra por debajo de los 3-4 μA , ya que valores más altos pueden derivar en problemas de electrolisis o en la pérdida de alguna de las fases por evaporación. Cuando se utiliza 1-octanol como membrana líquida, estos valores de intensidad se obtienen a voltajes inferiores a 200 voltios,

por lo que según la experiencia previa del Grupo de Investigación en el que se realizó este estudio, el voltaje de extracción se fijó en 150 voltios. De esta forma, se consiguió una migración electrocinética eficiente sin comprometer la estabilidad del sistema.

A continuación, se seleccionó el pH de las fases donadora y aceptora. El pH de la fase aceptora se fijó directamente a un valor de 12 utilizando NaOH 10 mM, ya que estudios previos con este tipo de compuestos coinciden en este valor de pH como el óptimo para la fase aceptora [60-62]. Para el pH de la fase donadora, se probaron dos valores extremos de pH, pH 12 (NaOH 10 mM) y el propio pH de la mezcla de todos los compuestos en agua ultrapura, cuyo valor estaba comprendido entre 5 y 6. En ambos casos, el pH resultante es mayor al pKa de todos los analitos, de forma que éstos se encontraban completamente ionizados a estos valores de pH. Los mejores resultados se obtuvieron cuando el pH de la fase donadora se mantuvo al pH de la propia disolución, por lo que todos los experimentos se realizaron sin ajustar el pH de la fase donadora a un valor concreto.

Por último, se evaluó el tiempo de extracción para valores de 3, 5 y 10 minutos. Cinco y diez minutos se descartaron puesto que en ambos casos se obtenían resultados muy similares y la extracción era prácticamente cuantitativa, lo que impediría determinar si se producía o no mejora en la eficacia de la misma en presencia de las AgNPs. En su lugar, se seleccionó tres minutos como tiempo óptimo ya que, a este tiempo, las recuperaciones obtenidas se situaban en torno al 50-60%, de modo que cualquier mejora en la eficacia de la extracción, en caso de producirse, sería más fácil de identificar.

Por lo tanto, las condiciones operacionales para determinar si la presencia de AgNPs en la FLM producía alguna mejora en la eficacia de la extracción, se fijaron como sigue: se aplicó una diferencia de potencial de 150 voltios a 2 μL de fase donadora a pH 5,4 durante 3 minutos utilizando 1-octanol y 1-octanol modificado con AgNPs como membranas líquidas libres (FLMs) para la extracción electrocinética de cinco antiinflamatorios no esteroideos (SAL, NAX, KTP, DIC e IBU) en 2 μL de fase aceptora a pH 12 ajustado con NaOH 10 mM.

4.5.4. Modificación de la membrana líquida libre con nanopartículas de plata

El primer estudio consistió en utilizar todas las dispersiones de AgNPs en 1-octanol como membranas líquidas para evaluar el grado de migración electrocinética de los compuestos seleccionados en presencia de las mismas. Los resultados obtenidos con cada una de ellas así como la intensidad promedio registrada durante la extracción, se recogen en la siguiente tabla (Tabla 4.5). Al ser el volumen de fase donadora igual al de la fase aceptora la preconcentración de los compuestos no era posible, por lo que los resultados se expresan en términos de porcentaje de recuperación.

Como puede verse, la dispersión número 3 es la que proporcionaba las recuperaciones de extracción más bajas para todos los compuestos. Con el resto de dispersiones, los resultados fueron mayores aunque bastante similares entre sí y próximos a los obtenidos con 1-octanol para todos los compuestos salvo para DIC. Para este último, las dispersiones 2 y 5 conducían a recuperaciones más bajas que las dispersiones 1 y 4.

Tabla 4.5. Recuperaciones obtenidas al utilizar 1-octanol y las distintas dispersiones de AgNPs en 1-octanol como FLMs.

| FLM | % Recuperación | | | | | Intensidad promedio (μA) |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------------------|
| | IBU | NAX | KTP | DIC | SAL | |
| 1-Octanol | 60.4 \pm 5.2 | 63.7 \pm 4.2 | 67.3 \pm 6.9 | 60.4 \pm 3.9 | 88.3 \pm 4.9 | 0.5 |
| Dispersión 1 | 55.8 \pm 2.4 | 60.2 \pm 3.3 | 60.1 \pm 1.0 | 52.7 \pm 3.9 | 92.7 \pm 2.0 | 1.8 |
| Dispersión 2 | 50.5 \pm 3.8 | 53.3 \pm 4.3 | 49.7 \pm 2.9 | 40.3 \pm 1.7 | 96.8 \pm 0.9 | 1.6 |
| Dispersión 3 | 37.8 \pm 2.9 | 32.7 \pm 5.3 | 38.1 \pm 4.1 | 32.1 \pm 3.2 | 70.2 \pm 1.3 | 2.5 |
| Dispersión 4 | 56.9 \pm 1.7 | 59.3 \pm 2.2 | 62.9 \pm 1.5 | 57.7 \pm 3.6 | 89.4 \pm 1.3 | 2.5 |
| Dispersión 5 | 58.8 \pm 2.9 | 62.8 \pm 0.2 | 60.8 \pm 0.3 | 45.7 \pm 3.7 | 85.4 \pm 5.2 | 2.1 |

Respecto a la intensidad de corriente promedio, se observó cómo en presencia de AgNPs aumenta entre 3 y 5 veces en comparación con la que se genera en ausencia de las mismas. Este comportamiento, difiere del que se observaba en los sistemas que utilizan fibras huecas como soporte para la membrana líquida (HF-EME). En dicho sistema, aunque la intensidad de corriente promedio en presencia de AgNPs era mayor que la registrada con 1-octanol puro (Figura 4.9, apartado 4.4.2.4), el valor de dicha intensidad era prácticamente el mismo independientemente de la dispersión de AgNPs que se utilizase.

Teniendo en cuenta todo esto, las dispersiones 2, 3 y 5 de AgNPs en 1-octanol se descartaron mientras que la 1 y la 4 se emplearon para los siguientes estudios.

En un segundo estudio, se planteó la posibilidad de que la concentración de AgNPs en el disolvente podía ser muy elevada, lo cual

estaría dificultando o limitando el paso de los compuestos de una fase a otra. Así pues, se analizó si la eficacia de la extracción mejoraba mediante la dilución de las dispersiones previamente seleccionadas.

Para ello se probaron, el primer lugar, diluciones (1:10), (1:50) y (1:100) de la dispersión 4. Los resultados que se recogen en la Tabla 4.6, muestran que la eficacia de la extracción disminuía a medida que aumentaba el grado en el que se diluía el 1-octanol modificado con AgNPs. El comportamiento observado era contrario al esperado, pues cuanto mayor era la dilución aplicada, menor era la concentración de AgNPs en el 1-octanol, por lo que los resultados deberían ser similares a los obtenidos con 1-octanol puro y, sin embargo, ocurría justo lo contrario.

Tabla 4.6. Recuperaciones obtenidas al diluir la dispersión 4 de AgNPs en 1-octanol. Los resultados se comparan con los obtenidos con 1-octanol y la propia dispersión 4.

| FLM | % Recuperación | | | | |
|-----------------------|----------------|------------|------------|------------|------------|
| | IBU | NAX | KTP | DIC | SAL |
| 1-Octanol | 60.4 ± 5.2 | 63.7 ± 4.2 | 67.3 ± 6.9 | 60.4 ± 3.9 | 88.3 ± 4.9 |
| Dispersión 4 | 56.9 ± 1.7 | 59.3 ± 2.2 | 62.9 ± 1.5 | 57.7 ± 3.6 | 89.4 ± 1.3 |
| Dilución 1:10 | 53.4 ± 4.2 | 63.1 ± 3.1 | 61.7 ± 5.2 | 52.6 ± 6.6 | 94.8 ± 9.4 |
| Dilución 1:50 | 47.9 ± 6.3 | 51.9 ± 7.9 | 54.2 ± 6.8 | 46.9 ± 4.8 | 90.6 ± 1.0 |
| Dilución 1:100 | 43.8 ± 7.2 | 49.1 ± 6.6 | 45.8 ± 5.1 | 36.4 ± 5.2 | 81.9 ± 2.4 |

Para comprobar si este comportamiento podía deberse a una dilución en exceso, se realizó un estudio similar con la dispersión 1 diluyéndola en menor grado. Se probaron diluciones (1:5), (1:10) y (1:25). Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Recuperaciones obtenidas al diluir la dispersión 1 de AgNPs en 1-octanol. Los resultados se comparan con los obtenidos con 1-octanol y la propia dispersión 1.

| FLM | % Recuperación | | | | |
|----------------------|----------------|------------|------------|------------|------------|
| | IBU | NAX | KTP | DIC | SAL |
| 1-Octanol | 60.4 ± 5.2 | 63.7 ± 4.2 | 67.3 ± 6.9 | 60.4 ± 3.9 | 88.3 ± 4.9 |
| Dispersión 1 | 55.8 ± 2.4 | 60.2 ± 3.3 | 60.1 ± 1.0 | 52.7 ± 3.9 | 92.7 ± 2.0 |
| Dilución 1:5 | 45.3 ± 4.4 | 45.6 ± 6.7 | 43.1 ± 5.6 | 40.1 ± 4.6 | 79.2 ± 6.2 |
| Dilución 1:10 | 33.1 ± 0.4 | 33.6 ± 0.4 | 37.2 ± 0.9 | 31.2 ± 0.3 | 67.1 ± 5.4 |
| Dilución 1:25 | 31.9 ± 1.2 | 33.6 ± 0.2 | 33.5 ± 0.5 | 27.9 ± 0.7 | 62.9 ± 2.4 |

Al igual que ocurría con la dispersión 4, la dilución de la dispersión 1 de AgNPS en 1-octanol tampoco produjo ninguna mejora en el rendimiento del proceso.

Por lo tanto, los resultados de este estudio indicaron que, independientemente de que la dilución que se aplicase fuese mayor o menor, el rendimiento de la extracción en términos de recuperación disminuía al aumentar la dilución efectuada

El último estudio, consistió en aplicar el procedimiento de extracción mediante μ -EME utilizando 1-octanol y la dispersión 1 de AgNPs como FLM para evaluar como varía la eficacia de la extracción de los analitos de interés a distintos tiempos de extracción. La elección de la dispersión 1 frente a la 4 se hizo teniendo en cuenta que, en ambos casos las recuperaciones eran prácticamente las mismas y que, además, la intensidad de corriente promedio registrada con la primera era ligeramente menor. Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas 4.8 y 4.9.

Tabla 4.8. Recuperaciones obtenidas a distintos tiempos de extracción utilizando 1-octanol como FLM.

| Tiempo (min) | % Recuperación | | | | |
|-----------------|----------------|------------|------------|------------|------------|
| | IBU | NAX | KTP | DIC | SAL |
| 1 | 11.3 ± 0.4 | 9.1 ± 1.1 | 9.1 ± 0.8 | 14.7 ± 0.3 | 33.9 ± 2.7 |
| 2 | 32.7 ± 2.8 | 33.2 ± 1.8 | 37.8 ± 0.9 | 40.3 ± 0.4 | 73.2 ± 4.9 |
| 3 | 60.4 ± 5.2 | 63.7 ± 4.2 | 67.3 ± 6.9 | 60.4 ± 3.9 | 88.3 ± 4.9 |
| 5 | 74.8 ± 3.2 | 75.1 ± 2.5 | 75.8 ± 1.7 | 76.2 ± 1.5 | 82.4 ± 6.2 |
| 7,5 | 90.9 ± 6.6 | 92.5 ± 2.9 | 94.7 ± 5.6 | 58.2 ± 4.2 | 96.1 ± 1.1 |
| 10 | 86.0 ± 5.4 | 65.9 ± 9.5 | 77.2 ± 4.0 | 25.0 ± 1.0 | 68.4 ± 4.8 |

Tabla 4.9. Recuperaciones obtenidas a distintos tiempos de extracción utilizando la dispersión 1 de AgNPs en 1-octanol como FLM.

| Tiempo (min) | % Recuperación | | | | |
|-----------------|----------------|------------|------------|------------|------------|
| | IBU | NAX | KTP | DIC | SAL |
| 1 | 9.1 ± 0.7 | 6.9 ± 0.9 | 6.9 ± 0.1 | 21.9 ± 0.8 | 42.2 ± 1.9 |
| 2 | 28.3 ± 2.4 | 27.0 ± 4.5 | 32.9 ± 2.6 | 50.5 ± 5.2 | 92.9 ± 6.6 |
| 3 | 56.9 ± 1.7 | 59.3 ± 2.2 | 62.9 ± 1.5 | 57.7 ± 3.6 | 89.4 ± 1.3 |
| 5 | 82.5 ± 5.5 | 81.6 ± 4.0 | 81.6 ± 4.1 | 73.1 ± 6.4 | 92.9 ± 3.2 |
| 7,5 | 81.7 ± 0.9 | 71.3 ± 2.4 | 65.1 ± 0.4 | 43.1 ± 6.7 | 77.5 ± 0.3 |
| 10 | 78.6 ± 4.7 | 51.6 ± 1.3 | 75.2 ± 5.4 | 40.9 ± 7.7 | 60.1 ± 6.6 |

Según los resultados que se recogen en la Tabla 4.9, mientras que con 1-octanol el mayor rendimiento de extracción se alcanzó a los 7,5 minutos para todos los compuestos (salvo para DIC, que a tiempos mayores a 5 minutos se degradaba), con la dispersión 1 de AgNPs se alcanzó a los 5 minutos. En principio, este resultado puede suponer una

mejora puesto que se consigue disminuir la duración de la extracción. Sin embargo, las recuperaciones que se obtienen en presencia de AgNPs a 5 minutos son menores que las que se alcanzan con 1-octanol a 7,5 minutos.

Por lo tanto, del mismo modo que en los sistemas HF-EME, puede concluirse que en los sistemas de μ -EME, la presencia de AgNPs en la membrana líquida tampoco logró mejorar la eficacia de la extracción, aun cuando estos sistemas no emplean ningún tipo de soporte que pueda aumentar la resistencia a la transferencia de masa.

Este comportamiento puede explicarse desde dos puntos de vista diferentes que se complementan entre sí. En la descripción de la síntesis de AgNPs (Apartado 4.3.1), se indicó que el exceso de agente reductor que no reacciona se adsorbe sobre la superficie de las mismas, dotándolas de carga negativa. Así, las nanopartículas cargadas negativamente actuarían como un *carrier* de tipo aniónico, los cuales prácticamente no interaccionan con los compuestos con carga negativa, de ahí que no se observe una mejora en la eficacia de la extracción de los AINEs estudiados. Por otra parte, al estar la superficie de las nanopartículas cargada, puede ocurrir que al aplicar una diferencia de potencial éstas cargas se desestabilicen y se rompa la dispersión, de forma que las cargas negativas de la superficie se orienten y se acumulen en torno al electrodo positivo del sistema, mientras que la plata sólida se oxida a plata (I), que se orienta hacia el electrodo negativo. De este modo, se produce un aumento del espesor de la doble capa eléctrica que se forma alrededor de la membrana líquida debido a la mayor acumulación de iones en las interfases entre la FLM y las correspondientes fases acuosas. Como resultado, la resistencia al

transporte iónico aumenta y, en consecuencia, la eficacia de la extracción disminuye. Este comportamiento corroboraría, además, la hipótesis anteriormente planteada con los soportes huecos, según la cual la eficacia de la extracción no mejora en presencia de AgNPs debido a que se produce un aumento de la resistencia al transporte iónico a pesar de que la tendencia observada en la intensidad de corriente indica que debería ocurrir lo contrario.

Estos resultados, no son los únicos en los que la presencia de materiales nanoestructurados en la membrana líquida produce un efecto negativo en la eficacia de la extracción. S. Yaripour et al. [63], encontraron que la modificación del disolvente orgánico con nanotubos de carbono (CNTs) o polímeros de impronta molecular (MIPs) y su posterior uso como membrana líquida soportada para la extracción de tartrazina en muestras de alimentos, provocaba una disminución de la migración electrocinética de dicho compuesto hacia la fase aceptora.

Así pues, aunque la incorporación de nanocompuestos en sistemas de extracción mediante electromembrana puede ser un enfoque de gran utilidad para aumentar el grado de interacción de los compuestos con la membrana líquida y mejorar así la eficacia del proceso, en algunos casos puede convertirse en un desafío complejo que ha de investigarse con más detalle.

Dado que la modificación de la membrana líquida con nanopartículas de plata no condujo a los resultados deseados, se planteó evaluar cuál sería el efecto que tendría la modificación de la misma con un *carrier* de tipo catiónico.

4.6. MODIFICACIÓN DE LA MEMBRANA LÍQUIDA SOPORTADA CON ALIQUAT®336 COMO CARRIER CATIÓNICO

El Aliquat®336 (cloruro de N-metil-N,N,N-trioctilamonio), es uno de los *carriers* catiónicos que se emplean con más frecuencia en los procesos de EME para la extracción de compuestos de naturaleza aniónica [63-65]. Se trata de una sal de amonio cuaternario, insoluble en agua, formada por tres cadenas lineales de ocho átomos de carbono (C₈) y un grupo metilo (CH₃) unidos a un átomo de nitrógeno (Figura 4.14). Esta estructura, hace que el nitrógeno presente una carga positiva permanente que le permite formar sales solubles en disolventes orgánicos en un rango de pH más amplio que las aminas primarias, secundarias y terciarias. Dicha carga positiva queda neutralizada por la presencia de iones cloruro.

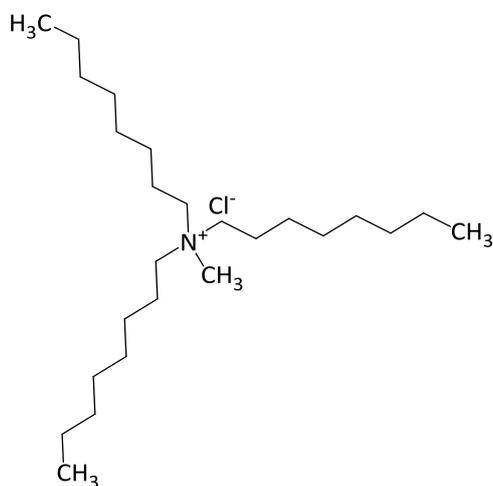


Figura 4.14. Estructura del Aliquat®336.

Debido a que el uso de *carriers* puede mejorar la extracción electrocinética de los compuestos [67] y teniendo en cuenta la naturaleza

ácida de los analitos estudiados, la presencia de un *carrier* catiónico como el Aliquat®336 en la membrana líquida podría contribuir a aumentar la transferencia de masa a través de la misma.

Con objeto de evaluar cómo influye la adición de Aliquat®336 en la membrana líquida, se probaron diferentes concentraciones de *carrier* disuelto en 1-octanol, comprendidas entre 0.1 y 5% (p/v). Los ensayos se realizaron utilizando el procedimiento descrito para la extracción mediante electromembrana de antiinflamatorios no esteroideos en sistemas que emplean fibras huecas como soporte para la membrana líquida (HF-EME). Para ello, se utilizaron las condiciones experimentales óptimas descritas en el apartado 2.3.1.5. La elección de este sistema se debió a que de los tres dispositivos evaluados, éste es el que permite obtener mayores factores de enriquecimiento. En este caso, la presencia de Aliquat®336 en la membrana líquida provocaba un aumento excesivo de la corriente que se generaba al aplicar la diferencia de potencial, con valores promedio que superaban los 2 mA, incluso cuando se disolvían pequeñas cantidades del *carrier* en la SLM. Este comportamiento, hacía que las reacciones de electrolisis se multiplicasen, observándose la formación de burbujas en torno al electrodo en contacto con la fase donadora. Como consecuencia, se perdía la estabilidad del sistema y los compuestos no se extraían, dado que el pH de ambas fases cambiaba drásticamente, aumentando el de la fase donadora hasta un valor de 10 mientras que el de la fase aceptora disminuía a un valor de 3.

Con el objetivo de reducir la intensidad de corriente generada y estabilizar el sistema, se realizaron algunas pruebas a voltajes más bajos utilizando las mismas concentraciones de *carrier* en la membrana líquida,

pero los resultados, en términos de recuperación, fueron prácticamente los mismos. Por lo tanto, la modificación de la membrana líquida con Aliquat®336 en sistemas con esta configuración no permitió mejorar la eficacia de la extracción.

No obstante, numerosas publicaciones así como la propia experiencia del Grupo de Investigación, avalan el efecto positivo que tiene sobre la eficacia de la extracción de compuestos de naturaleza ácida el uso de Aliquat®336 disuelto en la SLM [66,68,69]. Es por ello, que este mismo estudio sobre la modificación de 1-octanol con Aliquat®336 se llevó a cabo utilizando uno de los dos sistemas descritos en el apartado 3.1. El empleo del dispositivo microfluídico (μ F-EME), no tendría sentido teniendo en cuenta que con éste no se producía la preconcentración de la fase donadora y que los rendimientos de extracción, en las condiciones operacionales optimizadas, eran muy próximos al 100% para todos los compuestos. Por el contrario, las recuperaciones en torno al 20-35% que se obtienen con el sistema estático que emplea láminas planas como soporte para la membrana líquida (FM-EME), hacen de éste un buen candidato para mejorar los resultados mediante la modificación de la SLM con Aliquat®336.

Previamente a la optimización del correspondiente procedimiento de extracción, se realizaron una serie de ensayos preliminares para comprobar si la presencia del *carrier* en la membrana líquida conducía a los resultados deseados. Los ensayos se llevaron a cabo empleando como SLM 1-octanol modificado con concentraciones de Aliquat®336 comprendidas entre el 0,5 y el 2,5%. En todos los casos se obtuvieron resultados positivos y las recuperaciones fueron mayores a las obtenidas con 1-octanol.

4.6.1. Estudios previos sobre la estabilidad del sistema

Con objeto de mejorar la eficacia de la extracción electrocinética y, considerando que la presencia de Aliquat[®]336 en la membrana líquida hace aumentar la intensidad de corriente generada, además de la modificación de la SLM con el *carrier* se investigaron otros parámetros operacionales. Este estudio previo se realizó con la finalidad de asegurar la estabilidad del sistema, de forma que al incorporar el *carrier* la corriente eléctrica promedio no superase el límite por encima del cual el sistema deja de ser estable. Los parámetros adicionales evaluados fueron el espesor del soporte, la geometría de los electrodos y el disolvente orgánico empleado como SLM.

Los distintos ensayos, se llevaron a cabo empleando el mismo dispositivo y procedimiento experimental que se describen en el apartado 3.1.2. Como condiciones operacionales de partida, se seleccionaron los valores óptimos obtenidos para cada una de las variables operacionales previamente estudiadas. De este modo, se aplicó una diferencia de potencial de 80 voltios durante 12 minutos a 10 mL de una disolución donadora (pH 5, sin ajustar) de concentración $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todos los compuestos y que se agitó continuamente a una velocidad de 400 rpm. Los analitos se extrajeron en un volumen de fase aceptora de 250 μL (pH 12, NaOH 10 mM) que se analizó (20 μL) utilizando el mismo equipamiento y método de separación cromatográfico descritos en el apartado 2.1.

La intensidad de corriente generada, se registró (un dato cada 0.5 segundos) conectando en serie al sistema un multímetro digital que, a su vez, se conectaba a un ordenador.

4.6.1.1. *Influencia del espesor del soporte*

En primer lugar, se evaluó la influencia del espesor del soporte en la eficacia de la extracción electrocinética de los compuestos seleccionados. Recientemente, algunos autores [70-73] han descrito cómo la migración electrocinética de los analitos en los procedimientos de EME, puede variar en función del grosor del soporte que se utiliza para la SLM.

Se seleccionaron un total de tres láminas planas de polipropileno de distinto espesor como soporte para la SLM: (a). una lámina de 25 μm de espesor con un tamaño de poro de 0.21 μm x 0.05 μm y un 55% de porosidad (Celgard 2500 micro-porous membrane, Celgard, Charlotte, CN, EEUU), (b). una lámina de 65 μm de espesor con un tamaño de poro de 0,1 μm y una porosidad del X% (Polypropylene membrane PP013001, Sterlitech Corporation, Kent, WA, EEUU) y (c). una lámina de 100 μm de espesor con un tamaño de poro de X μm y una porosidad del X% (Accurel PP 1E R/P Membrana, Wuppertal, Alemania).

Las características técnicas de cada lámina, se determinaron mediante el análisis de las imágenes obtenidas al caracterizar cada uno de los soportes por microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello se utilizó un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (FEGSEM) FEI TENE0 del Servicio de Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Las imágenes correspondientes a cada una de las láminas de polipropileno seleccionadas se muestran en la Figura 4.15.

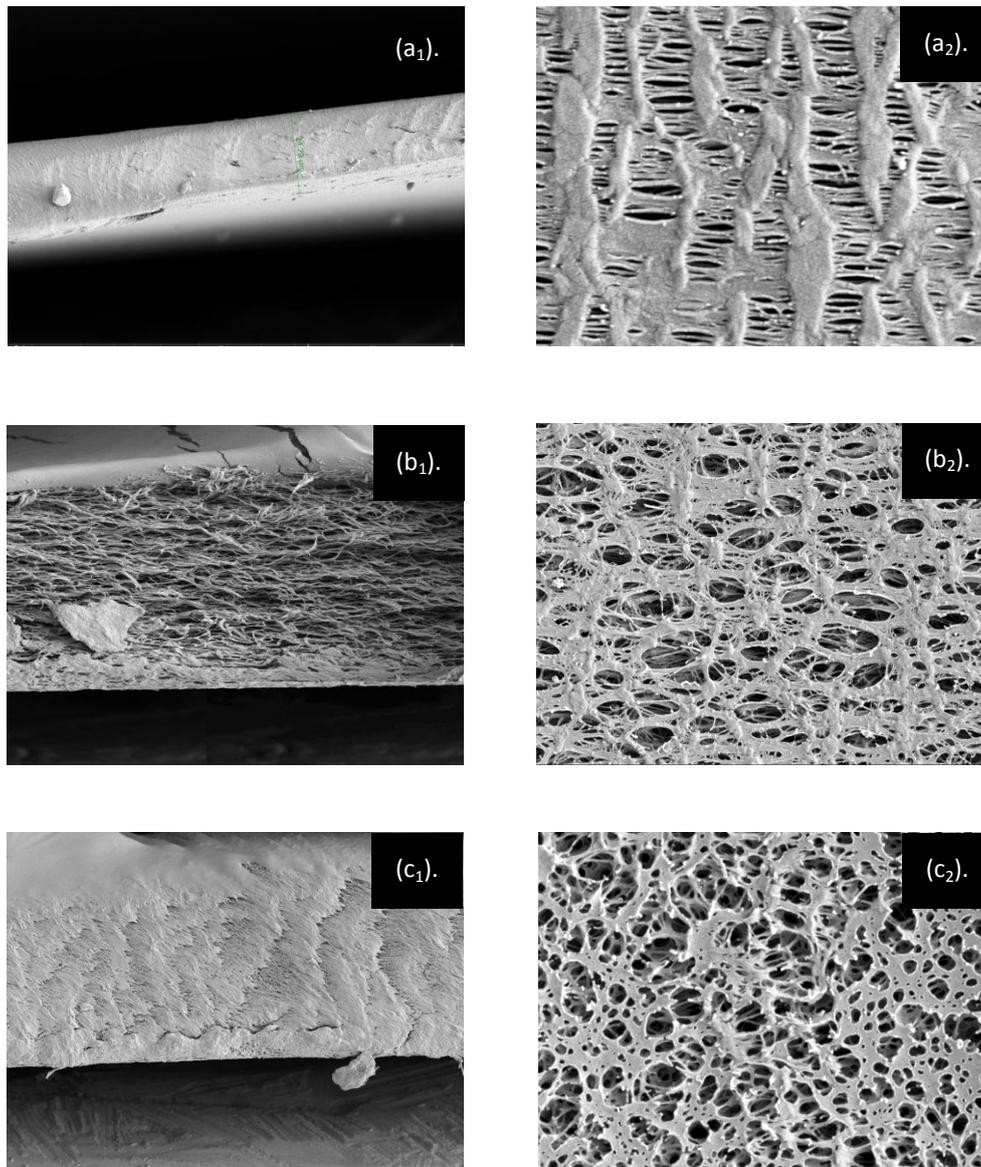


Figura 4.15. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) correspondientes a: (a₁). sección transversal y (a₂). estructura porosa superficial del soporte de 25 μm, (b₁). sección transversal y (b₂). estructura porosa superficial del soporte de 65 μm, (c₁). sección transversal y (c₂). estructura porosa superficial del soporte de 100 μm.

Los resultados obtenidos con cada uno de los soportes empleados (Figura 4.16), indicaron que el rendimiento de la extracción disminuía a medida que aumentaba el espesor del soporte. Con la lámina de 65 μm , (a excepción de DIC), las recuperaciones no fueron muy diferentes de las obtenidas con la de 25 μm . Aunque para el DIC dicha diferencia era más notable, con una disminución de la eficacia de la extracción del 35% respecto de la obtenida con la lámina de 25 μm , para SAL, KTP y NAX, la variación fue de apenas un 11-17%, mientras que para el IBU, los resultados fueron los mismos en ambos casos. Por el contrario, con la lámina de 100 μm , la eficacia del proceso disminuyó drásticamente para todos los compuestos, con porcentajes de recuperación comprendidos entre el 4-10%.

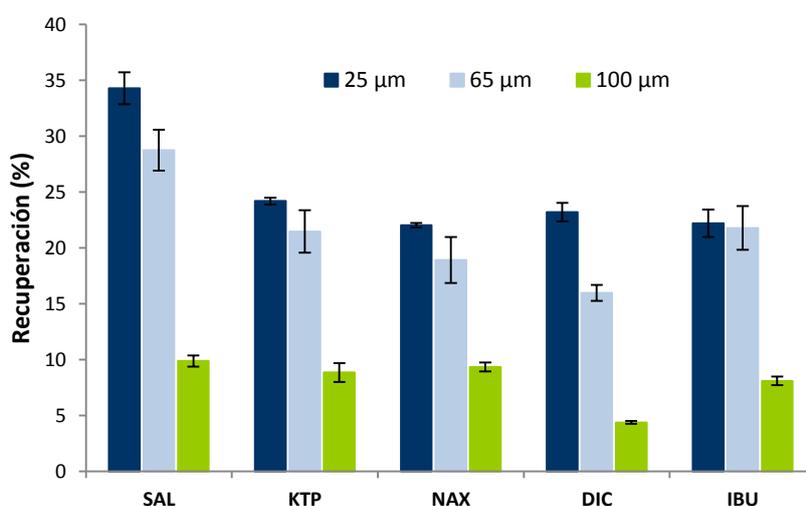


Figura 4.16. Influencia del espesor del soporte. %RSD < 10%.

Por otra parte, si se considera la intensidad de corriente registrada con cada tipo de soporte (Figura 4.17), puede verse que para las láminas de 25 μm y 65 μm seguía la misma tendencia, aunque la intensidad de

corriente promedio para la primera era mayor ($300 \mu\text{A}$) que para la segunda ($200 \mu\text{A}$). Sin embargo, con la lámina de $100 \mu\text{m}$, la intensidad de corriente promedio era mucho más baja en contraste con la de las otras dos membranas ($15 \mu\text{A}$) y, además, se mantuvo constante a lo largo de todo el tiempo que duraba la extracción. Este comportamiento puede explicarse fácilmente a partir de la ley de Ohm, dado que en condiciones de voltaje constante una disminución de la intensidad de corriente se traduce en un aumento de la resistencia eléctrica. Es decir, al aumentar el grosor del soporte, aumenta la resistencia a la migración electrocinética puesto que aumenta la trayectoria de migración y, en consecuencia, la distancia de difusión hasta la fase aceptora. Como resultado, se produce una disminución significativa en la transferencia de masa [73,74].

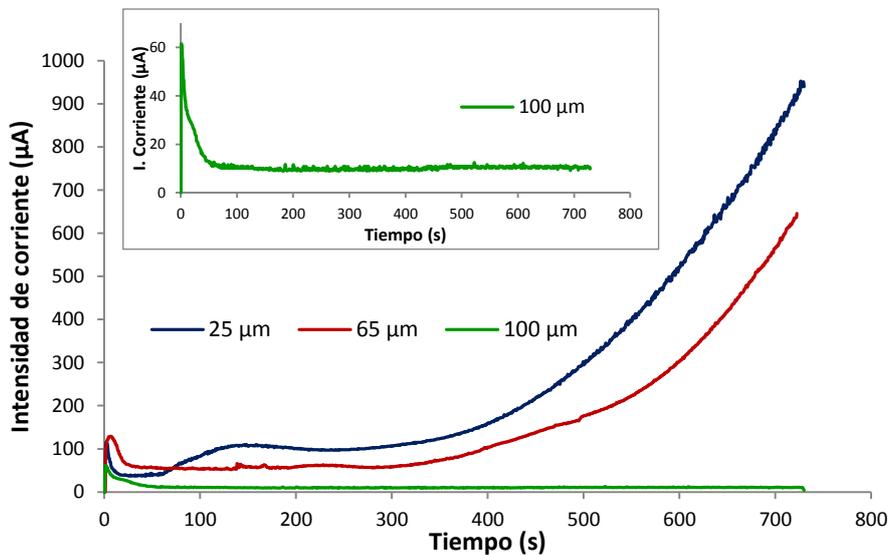


Figura 4.17. Tendencia de la intensidad de corriente eléctrica registrada con cada tipo de soporte plano.

Por lo tanto, a partir de este estudio se demostró que las mejores recuperaciones se alcanzaban con el soporte de menor espesor y que el aumento del grosor del mismo daba lugar a una disminución de los rendimientos de la extracción.

Por otro lado, la menor intensidad de corriente observada con el soporte de 100 μm parecía indicar que, tanto el voltaje como el tiempo de extracción, podrían aumentarse sin poner en juego la estabilidad del sistema. En ese sentido, se investigaron mayores voltajes y tiempos de extracción utilizando la lámina de 100 μm como soporte para comprobar si se producía alguna mejora en el rendimiento del proceso de EME. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 4.18. Como puede comprobarse (Figura 4.18 (a).), a voltajes superiores a 80 voltios, las recuperaciones aumentaron para todos los analitos, especialmente para SAL y DIC. Sin embargo, los resultados obtenidos a 100 y 120 voltios fueron muy similares para la mayoría de los compuestos, lo que parecía indicar que mayores voltajes no producirían mejora alguna en la eficacia del proceso. Así pues, el voltaje se fijó en 120 voltios para evaluar qué ocurría al aumentar el tiempo de extracción con este mismo soporte. Según la Figura 4.18 (b)., las recuperaciones aumentaban progresivamente desde los 12 a los 20 minutos, obteniéndose recuperaciones del 39%, 23%, 22%, 18% y 27% para SAL, KTP, NAX, DIC e IBU, respectivamente, al cabo de 20 minutos de extracción. Sin embargo, estos porcentajes eran prácticamente los mismos que se obtenían con el soporte de 25 μm en sus condiciones operacionales óptimas (34%, 24%, 22%, 23% y 22% para SAL, KTP, NAX, DIC e IBU, respectivamente). Por consiguiente, se concluyó que al aumentar el voltaje y el tiempo de extracción cuando se utiliza la lámina de 100 μm como soporte para la SLM, los resultados no mejoraban respecto de los ya

obtenidos con la lámina de 25 μm a menores voltajes y tiempos de extracción (80 voltios, 12 minutos).

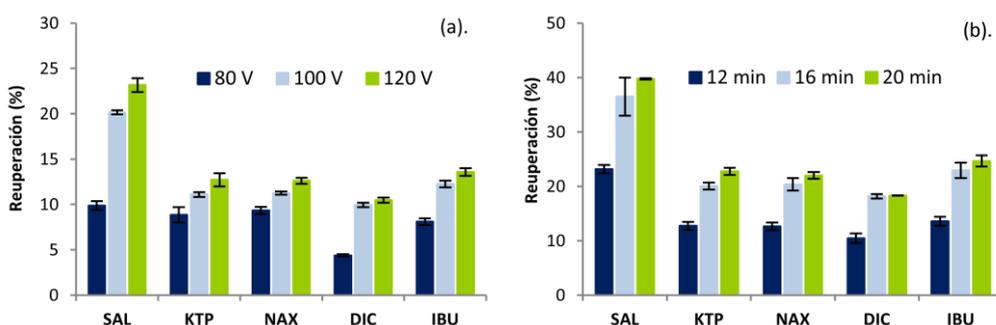


Figura 4.18. (a). Influencia del voltaje aplicado con la membrana de 100 μm para un tiempo de extracción de 12 minutos. %RSD < 6%. (b). Influencia del tiempo de extracción con la membrana de 100 μm para un voltaje de 120 voltios. %RSD < 6%.

Este mismo estudio se llevó a cabo con el soporte de 65 μm . Sin embargo, al igual que ocurría con el soporte de 25 μm , a voltajes y tiempos de extracción superiores a 80 voltios y 12 minutos, respectivamente, se perdía la estabilidad del sistema, observándose la formación de burbujas alrededor de los electrodos, lo que indicaba la presencia de un exceso de electrólisis. Así pues, se mantuvo la lámina de polipropileno de 25 μm de espesor como soporte óptimo para los estudios posteriores.

4.6.1.2. Influencia de la geometría de los electrodos

En los últimos años, se han publicado algunos trabajos relacionados con la modificación de la forma y la geometría de los electrodos que conducen a una mejora del rendimiento de los procesos de EME. De este modo, Y.A. Asl et al. [75], describieron el uso de un electrodo cilíndrico

externo que rodeaba una fibra hueca para aumentar la estabilidad de la SLM y mejorar la eficacia de extracción. H.R. Moazami et al. [76], investigaron cómo la geometría del electrodo externo puede afectar al rendimiento del proceso utilizando tres geometrías diferentes para el mismo. Por otro lado, S. Asadi et al. [77], introdujeron el uso de un electrodo giratorio en la fase aceptora para aumentar la transferencia de masa desde la SLM a la fase aceptora mediante la reducción del espesor de la doble capa eléctrica. Más recientemente, H.R. Moazami [78], propuso el uso de un electrodo de platino de cabeza redonda como electrodo interno para aumentar la estabilidad del sistema y mejorar el rendimiento de la extracción.

Así pues, para evaluar si el uso de diferentes geometrías de electrodos podría incrementar la estabilidad del sistema y mejorar las recuperaciones de la extracción, se investigaron cuatro configuraciones diferentes. En la Figura 4.19 se representan las distintas geometrías seleccionadas para los electrodos internos y externos en cada caso. En la primera geometría, (a). se utilizaron dos hilos de platino que terminaban en forma de espiral. El electrodo interno estaba formado por una espiral de 3 mm de diámetro y 3 mm de altura, mientras que el electrodo externo tenía forma de "L" y terminaba en una espiral plana de 8 mm de diámetro. La segunda geometría, (b). estaba formada por dos hilos de platino que terminan en ángulo recto. Las formas internas y externas en "L" tenían una longitud de 4 mm y 10 mm respectivamente. La tercera geometría (c)., combinaba el electrodo interno de la geometría (a). con el electrodo externo de la geometría (b). En la cuarta y última geometría estudiada (d)., se combinó el electrodo interno de la geometría (b). con el electrodo

externo de la geometría (a). Todos los electrodos de platino empleados tenían un espesor de 0.25 mm.

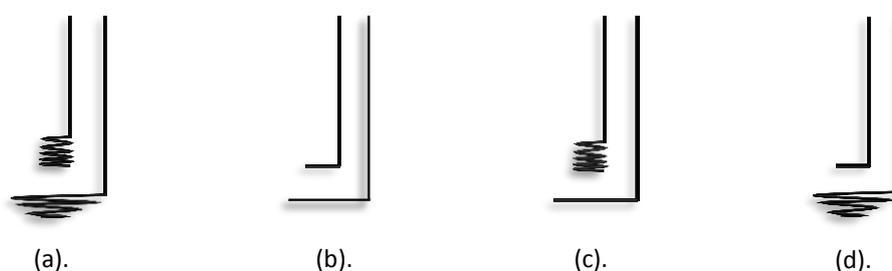


Figura 4.19. Esquema de las distintas configuraciones de electrodos evaluadas.

Como se observa en la Tabla 4.10, las recuperaciones obtenidas para cada analito con las distintas geometrías de electrodo eran prácticamente las mismas y no diferían en más de un 5% en ninguno de los casos. Por lo tanto, este parámetro parece no afectar a la eficacia del proceso.

Tabla 4.10. Recuperaciones obtenidas con las diferentes configuraciones de electrodos.

| Config. | Recuperación (%) ^a | | | | | Corriente promedio (μA) |
|---------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------|
| | SAL ^b | KTP ^c | NAX ^b | DIC ^c | IBU ^b | |
| (a). | 34.3 ± 0.7 | 24.2 ± 2.1 | 22.3 ± 2.1 | 23.2 ± 1.6 | 22.3 ± 1.6 | 300 |
| (b). | 30.7 ± 1.6 | 20.2 ± 1.3 | 20.2 ± 1.2 | 19.0 ± 0.9 | 19.5 ± 1.8 | 270 |
| (c). | 29.1 ± 1.8 | 19.7 ± 0.8 | 19.5 ± 1.8 | 20.7 ± 1.7 | 18.9 ± 1.6 | 250 |
| (d). | 31.5 ± 1.7 | 20.5 ± 1.4 | 20.5 ± 1.6 | 21.5 ± 0.9 | 21.4 ± 1.0 | 260 |

^aMedia de tres determinaciones ± desviación estándar. %RSD < 9%

^bDetección por FLD

^cDetección por DAD

De acuerdo con los gráficos de intensidad de corriente que se representan en la Figura 4.20, todas las curvas presentan la misma De

acuerdo con los gráficos de intensidad de corriente que se representan en la Figura 4.20, todas las curvas presentan la misma tendencia, según la cual la corriente permanece constante durante los primeros cinco minutos de extracción, tiempo a partir del cual comienza a aumentar de forma progresiva. Aunque en todos los casos las recuperaciones eran similares, hay que destacar que los resultados más altos se alcanzaban con la configuración (a), que, además, era la que generaba una mayor intensidad de corriente promedio durante la extracción.

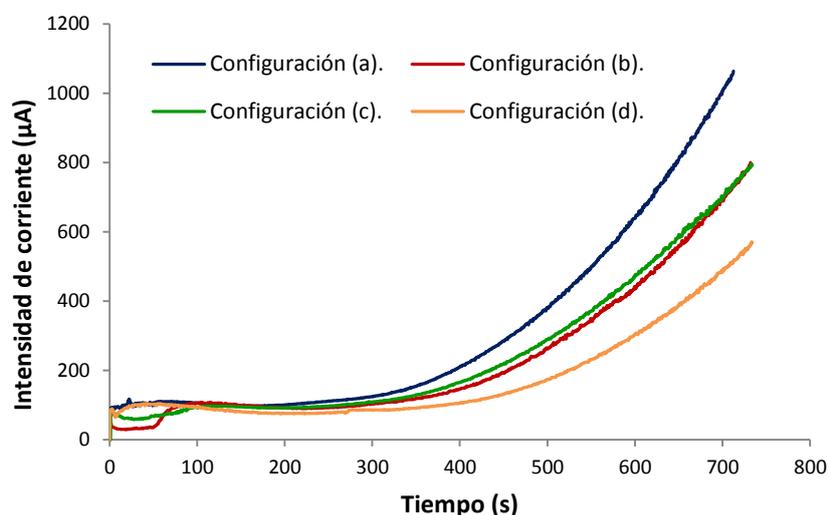


Figura 4.20. Tendencia de la intensidad de corriente registrada con las diferentes configuraciones de electrodos.

4.6.1.3. Alcoholes lineales como membranas líquidas soportadas

La naturaleza química de la membrana líquida soportada, tiene un papel importante en la extracción mediante electromembrana debido a que está directamente relacionada tanto con la transferencia de masa como con la selectividad del sistema. Por lo tanto, la selección de un

disolvente orgánico adecuado es primordial para lograr que la extracción sea selectiva, reproducible y eficiente [79,80].

Teniendo en cuenta que para la extracción de fármacos ácidos los disolventes más apropiados son los alcoholes alifáticos de cadena larga, debido a sus elevados valores de polarizabilidad (π) y acidez del enlace de hidrógeno (α), se probaron, además de 1-octanol, otros alcoholes lineales como posibles SLMs: 1-nonanol (9 C), 1-decanol (10 C), 1-undecanol (11 C) y 1-dodecanol (12 C).

Los resultados revelaron que los alcoholes con más de 8 átomos de carbono, proporcionaban rendimientos de extracción más bajos (Figura 4.21). El 1-decanol, el 1-undecanol y el 1-dodecanol fueron los disolventes menos eficaces como SLM, puesto que las recuperaciones disminuyeron en más de un 50% con respecto a las obtenidas con 1-octanol. Con 1-nonanol, se obtuvieron recuperaciones mayores, aunque eran entre un 4-10% más bajas que las que se alcanzaban con 1-octanol. Por otra parte, mientras que con 1-octanol, 1-nonanol y 1-decanol los resultados eran reproducibles, el uso de 1-undecanol y 1-dodecanol como SLM proporcionaba diferentes recuperaciones cada vez y, por lo tanto, resultados poco reproducibles en lo que a la eficacia de extracción se refiere. La principal razón de este comportamiento es el aumento de la viscosidad y la menor afinidad de los analitos por el disolvente, lo que se traduce en un flujo más lento a través de la membrana líquida [16].

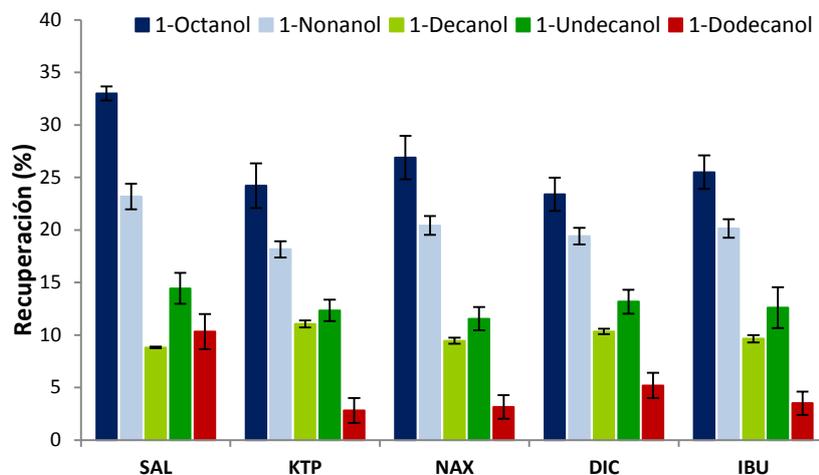


Figura 4.21. Recuperaciones obtenidas con los diferentes alcoholes alifáticos empleados como SLM. %RSD < 10%.

Al igual que en los ensayos anteriores, se registró la intensidad de corriente generada al utilizar cada uno de estos disolventes como SLM. Según la Figura 4.22, 1-octanol, 1-nonanol y 1-decanol generan intensidades uniformes y reproducibles, con valores promedio que disminuyen en el orden 1-octanol > 1-nonanol > 1-decanol. Sin embargo, las curvas correspondientes a 1-undecanol y 1-dodecanol no aparecen representadas debido a que con ambos disolventes las tendencias obtenidas no eran reproducibles de una extracción a otra. Este comportamiento de la corriente eléctrica se corresponde con la discusión previa sobre las tendencias observadas para las recuperaciones de extracción obtenidas con cada uno de los disolventes. Es decir, como cabía esperar, cuanto menor es la intensidad de corriente que se genera en este sistema, menor es la eficacia del proceso.

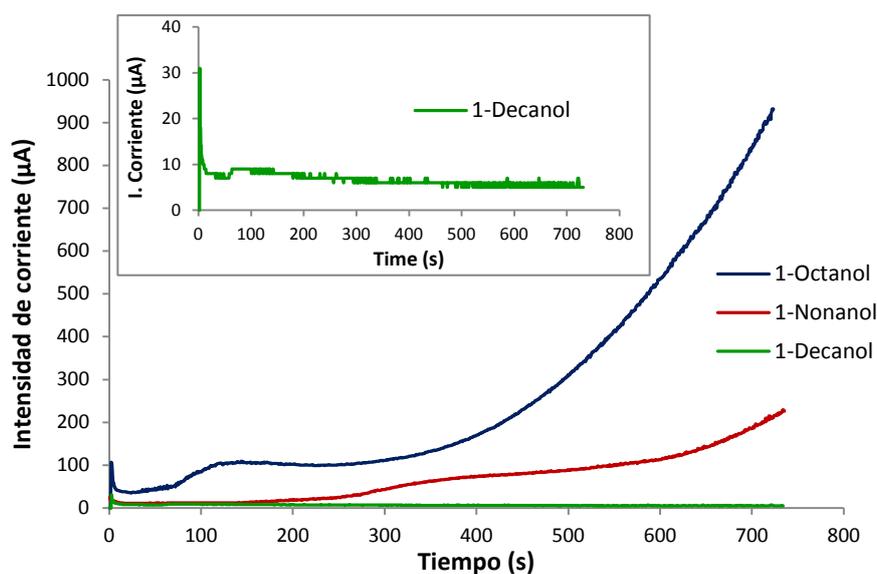


Figura 4.22. Tendencia de la intensidad de corriente registrada al emplear 1-octanol, 1-nonanol y 1-decanol como SLM.

Por otra parte, algunos autores han sustituido el 1-octanol por 1-nonanol ya que, debido a su menor solubilidad en agua, contribuye a mejorar la estabilidad del sistema [79]. Así pues, teniendo en cuenta que con 1-nonanol, la corriente eléctrica promedio era casi cinco veces menor (300 μA para 1-octanol frente a 60 μA para 1-nonanol) y que las recuperaciones eran bastante próximas a las obtenidas con 1-octanol (sólo diferían entre un 4-10%), ambos disolventes se seleccionaron para llevar a cabo el resto de los experimentos.

4.6.2. Modificación de la membrana líquida soportada con Aliquat®336

En este apartado, se analiza si la presencia de Aliquat®336 disuelto en la membrana líquida contribuye a mejorar la eficacia de la extracción de los compuestos analizados, al igual que se hizo inicialmente con el

dispositivo que emplea fibras huecas como soporte para la SLM (HF-EME). No obstante, teniendo en cuenta que la adición del *carrier* en la SLM aumenta la intensidad de la corriente que se genera durante la extracción, se evaluó cómo influye la presencia de Aliquat®336 tanto en 1-octanol como en 1-nonanol.

Se emplearon diferentes cantidades de *carrier* disuelto en cada uno de los disolventes para evaluar la influencia de la concentración del mismo en el rendimiento de la extracción. Así, para el 1-octanol, se analizaron concentraciones de Aliquat®336 comprendidas entre 0.1-1% (p/v). Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 4.23.

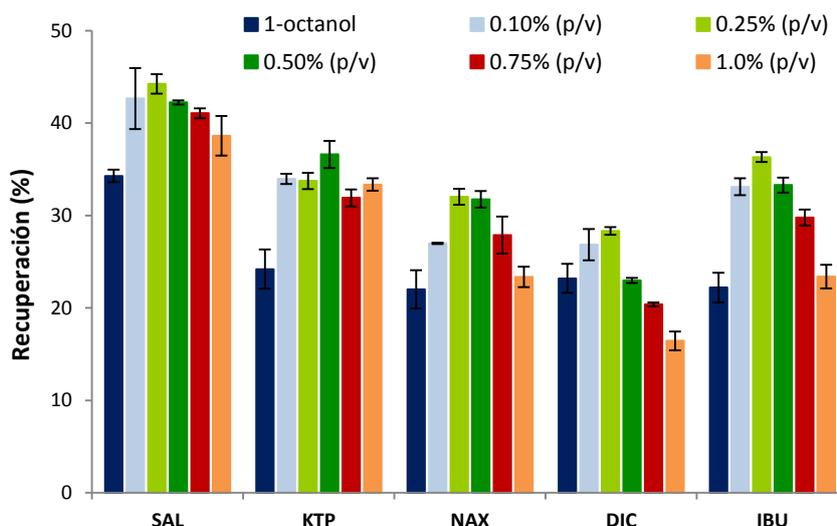


Figura 4.23. Influencia de la concentración de *carrier* disuelto en 1-octanol. %RSD < 9%.

Como puede verse, en comparación con 1-octanol puro, el rendimiento de la extracción mejoró para todas las concentraciones de *carrier* ensayadas salvo para DIC, para el que la mejora sólo se producía en

presencia de un 0.1 y un 0.25% (p/v) de Aliquat®336. Los mejores resultados, se obtuvieron para una concentración del 0.25% (p/v) para SAL, NAX, DIC e IBU y del 0.5% (p/v) para KTP, con recuperaciones que mejoraron entre un 22% para DIC y un 60% para IBU respecto de las obtenidas con 1-octanol. Por lo tanto, para este disolvente se estableció como cantidad óptima de *carrier* disuelto un 0.25% (p/v) dado que a esta concentración, la mayor parte de los compuestos presentaban la máxima eficacia de extracción.

Para el 1-nonanol, se evaluaron concentraciones de Aliquat®336 comprendidas entre 0.5-7.5% (p/v). Según las recuperaciones representadas en la Figura 4.24, el rendimiento de la extracción aumentaba progresivamente para todos los compuestos al aumentar la cantidad de *carrier* disuelto en la SLM hasta un 2.5% (p/v), mientras que para cantidades superiores comenzaba a disminuir. Además, al igual que ocurría con el 1-octanol, con cualquiera de las concentraciones de *carrier* ensayadas, el rendimiento de la extracción era mayor que el obtenido con 1-nonanol puro. Por consiguiente, para este disolvente se estableció como cantidad óptima de Aliquat®336 un 2.5% (p/v). Con esta concentración, las recuperaciones fueron: 53% para SAL, 45% para KTP, 43% para NAX, 38% para DIC y 45% para IBU. Dichas recuperaciones, además, fueron entre un 105 y un 150% mayores respecto de las que proporcionaba el 1-nonanol puro y entre un 56 y un 96% respecto de las obtenidas con 1-octanol puro.

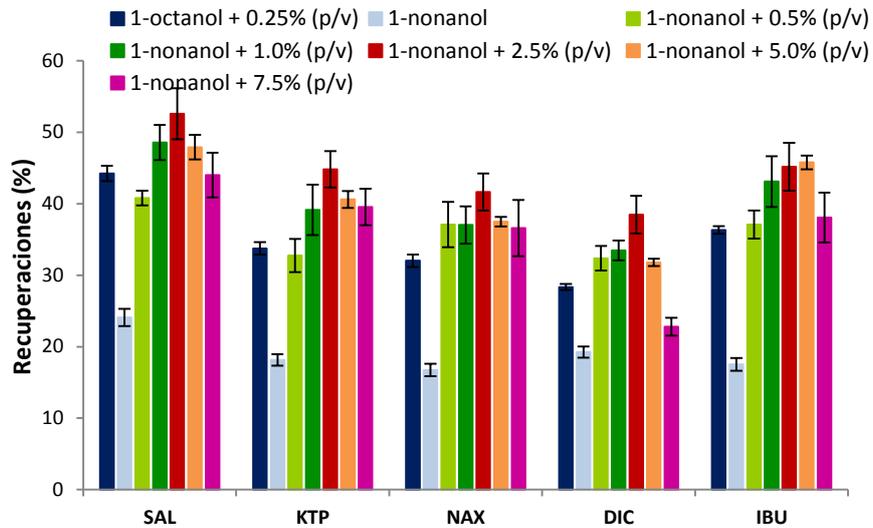


Figura 4.24. Influencia de la concentración de *carrier* disuelto en 1-nonanol. %RSD < 9%.

Así pues, puede decirse que las mejoras observadas en la eficacia de la extracción fueron mayores para la combinación 1-nonanol + Aliquat®336 que para la combinación 1-octanol + Aliquat®336, independientemente de cuál fuera la concentración del *carrier* en cada uno de los disolventes. Esto último se explica porque incluso los resultados más bajos obtenidos con 1-nonanol en presencia de Aliquat®336 (0.5% (p/v); 41% para SAL, 33% para KTP, 37% para NAX, 32% para DIC y 37% para IBU), fueron iguales o superiores a los obtenidos con 1-octanol a su concentración óptima de *carrier* (0.25% (p/v); 43% para SAL, 34% para KTP, 32% para NAX, 28% para DIC y 36% para IBU). Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto el efecto positivo que tiene sobre el rendimiento del proceso la modificación de la membrana líquida con un *carrier* de tipo catiónico para la extracción de compuestos de naturaleza aniónica.

Respecto a la intensidad de corriente, la adición del *carrier* en la SLM provocaba un ligero aumento de la misma. Sin embargo, al contrario de lo

que ocurría en los dispositivos HF-EME, dicho aumento no fue muy acusado por lo que no se observó electrólisis y el sistema se mantuvo estable durante todo el tiempo de extracción con los dos disolventes modificados. La Figura 4.25, representa cómo evoluciona la intensidad de corriente con cada disolvente tanto en presencia como en ausencia de *carrier*. Como se observa, la presencia de este último, provocaba, además de un aumento de la corriente eléctrica total, una ligera modificación en la tendencia de la curva de intensidad al comienzo del proceso (especialmente para 1-nonanol), debido a los mayores valores de corriente registrados en ese instante de tiempo.

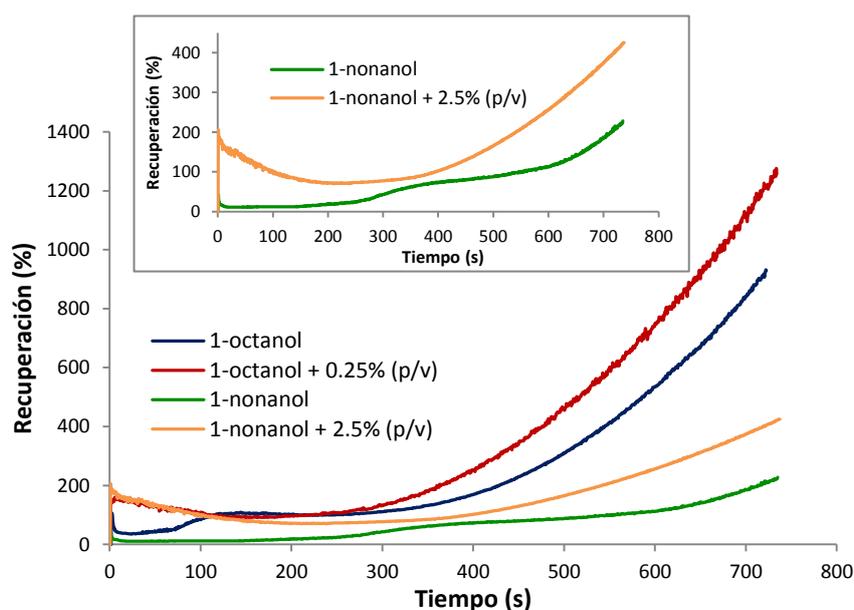


Figura 4.25. Tendencia de la intensidad de corriente registrada cuando se emplean 1-octanol, 1-octanol + 0.25% (p/v) de Aliquat®336, 1-nonanol y 1-nonanol + 2.5% (p/v) de Aliquat®336 como SLM.

Por otra parte, la mayor resistencia eléctrica que ofrece el 1-nonanol en comparación con el 1-octanol, incluso en presencia del Aliquat®336,

parece indicar que se podrían aplicar mayores voltajes y/o incrementar los tiempos de extracción. Así pues, se probó a aumentar tanto el voltaje como el tiempo de extracción utilizando 1-nonanol + 2.5% p/v de Aliquat®336 como SLM. Los resultados (Figura 4.26) revelaron que ni aumentando el voltaje aplicado y/o el tiempo de extracción, se conseguía mejorar la eficacia del proceso. De hecho, voltajes superiores a 80 voltios generaban un notable aumento de la corriente promedio, especialmente a 120 voltios, lo que dio como resultado la formación de burbujas tanto en la disolución donadora como en la aceptora. Por su parte, al aumentar la duración de la extracción manteniendo constante el voltaje en 80 voltios, los resultados fueron prácticamente iguales o ligeramente más bajos que los obtenidos al tiempo de extracción óptimo (12 minutos) (Figura 4.24 (b)).

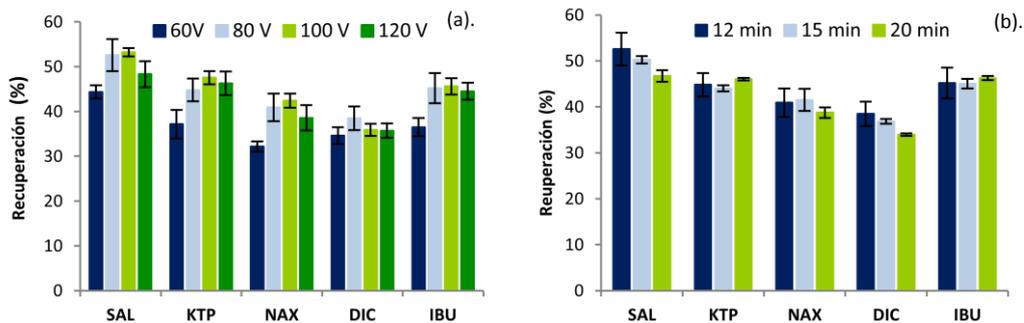


Figura 4.26. (a). Influencia del voltaje aplicado usando 1-nonanol + 2.5% p/v Aliquat®336 como SLM a un tiempo de extracción de 12 minutos. %RSD < 7%. (b). Influencia del tiempo de extracción usando 1-nonanol + 2.5% (p/v) Aliquat®336 como SLM a un voltaje de 80 voltios. %RSD < 7%.

Por lo tanto, los estudios adicionales realizados sobre el procedimiento de extracción previamente descrito para la extracción de antiinflamatorios no esteroideos con el dispositivo FM-EME, permitieron mejorar la eficacia del proceso en más de un 56% al sustituir el 1-octanol

por 1-nonanol modificado con Aliquat®336 (2.5% p/v) como SLM. De este modo, las condiciones operacionales óptimas para este dispositivo se establecieron finalmente como sigue: pH 5 para la fase donadora (pH sin controlar de la disolución donadora conteniendo todos los AINEs a una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$), pH 12 (NaOH 10 mM) para la fase aceptora, 80 voltios, 12 minutos, 1-nonanol + 2.5% p/v Aliquat®336 como SLM y 400 rpm como velocidad de agitación. La intensidad de corriente media registrada en estas condiciones fue de $160 \mu\text{A}$ y las recuperaciones obtenidas para cada uno de los AINEs estudiados fueron: 53% para SAL, 45% para KTP, 42% para NAX, 39% para DIC y 45% para IBU.

4.6.3. Validación de la metodología propuesta

Una vez establecidas las condiciones operacionales óptimas para este estudio, se llevó a cabo la validación analítica del método propuesto mediante la evaluación de la linealidad, la sensibilidad, la precisión y la exactitud. Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11. Resultados de la validación del procedimiento de EME propuesto.

| AINEs | Rango lineal (ng mL^{-1}) | Linealidad | | LOD (ng mL^{-1}) | LOQ (ng mL^{-1}) | Recuperación (%) | EF |
|------------------|--------------------------------------|------------|-------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|----|
| | | (r^2) | (%) | | | | |
| SAL ^a | 1.5-150 | 0.999 | 99.38 | 0.5 | 1.5 | 53 | 27 |
| KTP ^b | 1.5-150 | 0.9988 | 98.29 | 1 | 1.5 | 45 | 23 |
| NAX ^a | 0.05-150 | 0.9996 | 99.10 | 0.02 | 0.05 | 42 | 21 |
| DIC ^b | 3-150 | 0.9983 | 97.94 | 2 | 3 | 39 | 20 |
| IBU ^a | 2.5-150 | 0.9995 | 98.85 | 1.5 | 2.5 | 45 | 23 |

^aDetección por FLD

^bDetección por DAD

La linealidad se evaluó mediante una recta de calibrado externo de 7 puntos (obtenidos cada uno por triplicado) resultado de aplicar el procedimiento de EME propuesto a disoluciones patrón de los compuestos estudiados de concentraciones comprendidas entre 0.05 y 150 ng mL⁻¹. Como se observa, se obtuvieron buenos resultados en términos de linealidad para todos los AINEs seleccionados dentro de sus correspondientes rangos de concentración evaluados, con valores comprendidos entre el 97.9% para DIC y el 99.4% para SAL, expresados como porcentaje de linealidad y coeficientes de correlación $r^2 > 0.998$.

Los límites de detección (LODs) y de cuantificación (LOQs) se calcularon como la mínima cantidad de analito con la que se obtienen picos cuya relación señal/ruido es igual a tres y diez, respectivamente [81]. Para KTP y DIC, los límites de detección y cuantificación se obtuvieron mediante detección por DAD mientras que para SAL, NAX e IBU, se determinaron por FLD. D, los LODs se situaron entre 0.02 ng mL⁻¹ para NAX y 2 ng mL⁻¹ para DIC, mientras que los LOQs oscilaron entre 0.04 ng mL⁻¹ para NAX y 3 ng mL⁻¹ para DIC.

Por su parte, la repetibilidad y la precisión intermedia se determinaron aplicando (por triplicado) el procedimiento de EME propuesto a disoluciones patrón de los analitos preparadas a tres niveles de concentración (15, 60 y 120 ng mL⁻¹) y que se midieron en un solo día (repetibilidad) y un día a la semana durante dos meses (precisión intermedia). Los valores obtenidos para la desviación estándar relativa (%RSD) oscilaban entre el 2-9 % para la repetibilidad y el 5-10% para la precisión intermedia.

Finalmente, se evaluó la exactitud del método a partir de ensayos de recuperación en muestras de orina previamente diluidas (1:500 v/v) con agua ultrapura y fortificadas con todos los AINEs a tres niveles de concentración (20, 70 y 125 ng mL⁻¹). Las recuperaciones se calcularon como el porcentaje de compuesto extraído, obteniéndose valores superiores al 78%, con porcentajes de desviación estándar relativas inferiores al 2.5% (Tabla 4.12). Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre las recuperaciones obtenidas para cada uno de los tres niveles de concentración a los que se doparon las muestras de orina.

Tabla 4.12. Porcentaje de recuperación en muestras de orina diluidas (1:500) y fortificadas a tres niveles de concentración con todos los AINEs estudiados.

| Nivel dopado (ng mL ⁻¹) | Recuperación (%) ^a | | | | |
|--|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | SAL ^b | KTP ^c | NAX ^b | DIC ^c | IBU ^b |
| 20 | 80.8 ± 5.9 | 94.5 ± 4.9 | 84.5 ± 7.4 | 98.8 ± 7.5 | 82.5 ± 6.3 |
| 70 | 77.7 ± 6.0 | 91.9 ± 4.7 | 80.1 ± 5.2 | 95.7 ± 7.7 | 87.7 ± 5.7 |
| 125 | 78.5 ± 5.6 | 90.4 ± 5.9 | 82.5 ± 6.5 | 84.7 ± 6.3 | 87.1 ± 5.4 |

^aMedia de tres determinaciones ± desviación estándar. %RSD < 8.5%

^bDetección por FLD

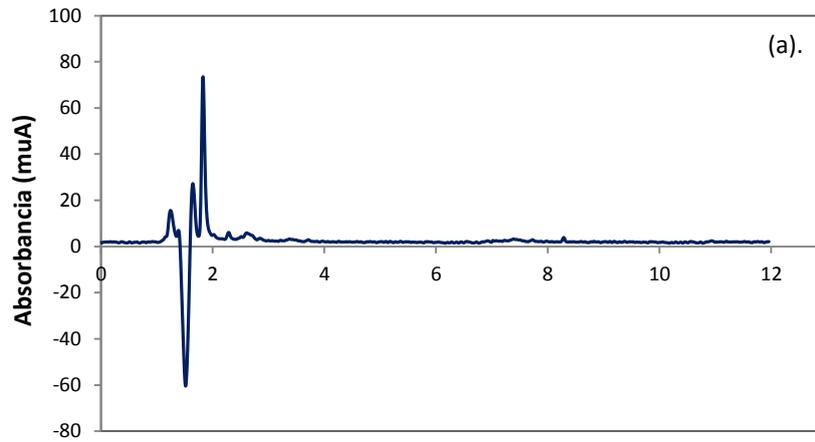
^cDetección por DAD

Por lo tanto, según los resultados obtenidos para los diferentes parámetros evaluados, puede decirse que el procedimiento de EME propuesto permite alcanzar buenos rendimientos en términos de precisión, linealidad, sensibilidad y exactitud para todos los compuestos analizados.

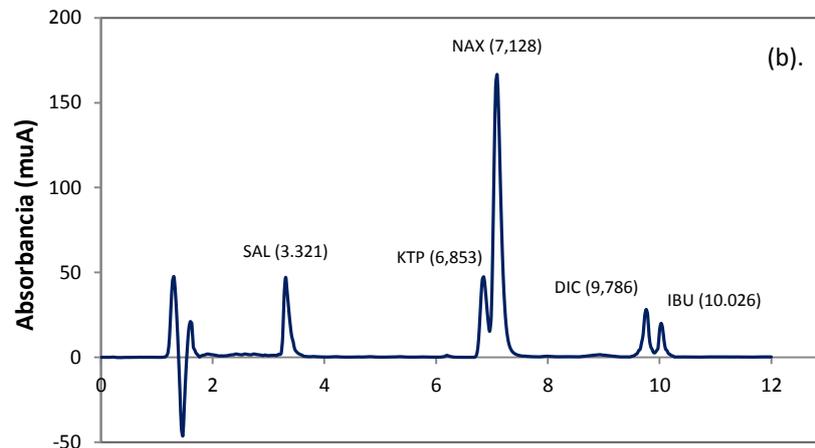
4.6.3.1. Aplicación a muestras de orina

Para comprobar si el método de extracción electrocinética obtenido se puede aplicar con éxito al análisis de muestras reales, se utilizaron muestras de orina humana procedentes de voluntarios adultos bajo tratamiento médico. Dichas muestras, fueron convenientemente almacenadas a una temperatura de 4°C hasta su análisis. Se analizaron dos muestras que contenían SAL e IBU respectivamente y que fueron recogidas a las 2 horas 30 minutos de la ingesta de un comprimido de 500 mg de ácido acetil salicílico (ASA) (Bayer®) en el primer caso y a las 8 horas de la administración oral de un comprimido de 600 mg de IBU (Normon®).

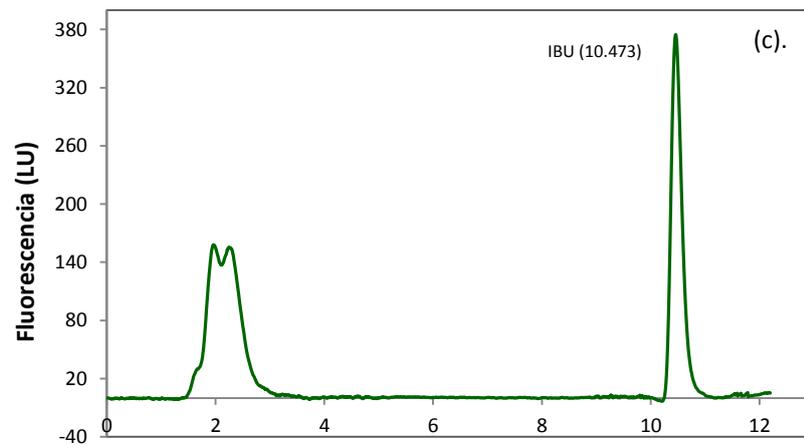
Las muestras se microfiltraron (0.22 µm), se diluyeron con agua ultrapura (1:500, v/v) y se sometieron, por triplicado, al procedimiento de EME anteriormente descrito. Los extractos obtenidos, se analizaron mediante HPLC-DAD/FLD. La Figura 4.27, muestra los cromatogramas correspondientes a: (a). blanco de orina humana, (b). muestra de orina humana fortificada con una mezcla de concentración 125 ng mL⁻¹ para todos los AINEs, (c). muestra de orina recogida a las 2 horas 30 minutos de la administración oral de una dosis de 500 mg de ASA y (d). muestra de orina recogida a las 8 horas de la ingesta de una dosis de 600 mg de IBU. Como puede verse, todos los cromatogramas presentan una buena línea base así como picos bien definidos y resueltos para todos los compuestos. Además, en el intervalo de tiempo en el que aparecen las señales, no se observan picos adicionales que podrían corresponder a otros compuestos presentes en la orina, lo que pone de manifiesto la buena selectividad del método así como un excelente *clean-up*.



Tiempo (minutos)



Tiempo (minutos)



Tiempo (minutos)

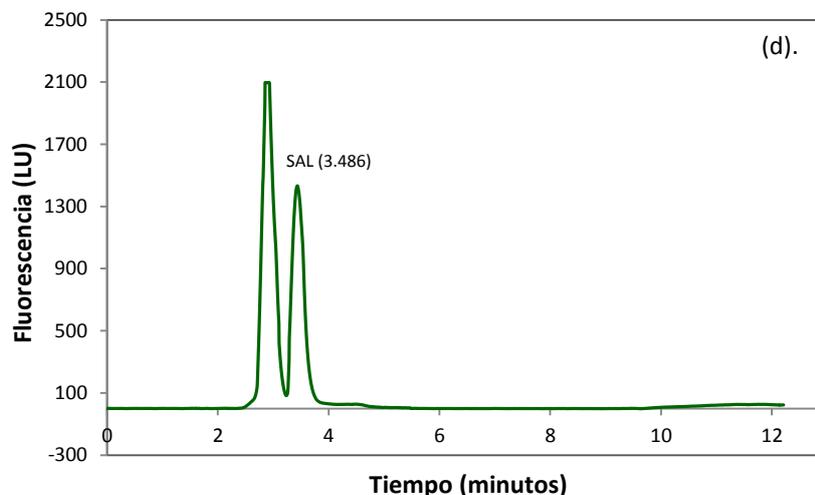


Figura 4.27. Cromatogramas obtenidos por HPLC correspondientes las muestras de orina humana sometidas al procedimiento de EME propuesto: (a). blanco de orina (DAD; λ : 235 nm), (b). muestra de orina fortificada con una mezcla de concentración 125 ng mL^{-1} para todos los AINEs (DAD; λ : 235 nm), (c). muestra de orina recogida a las 2 horas 30 minutos de la ingesta de una dosis de 500 mg de ASA (FLD) y (d). muestra de orina recogida a las 8 horas de la ingesta de una dosis de 600 mg de IBU (FLD).

Según la bibliografía, una vez en el organismo, el ácido acetil salicílico (ASA) se hidroliza a ácido salicílico (SAL), compuesto que también es farmacológicamente activo y, como tal, tiene efectos analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos. La aspirina se metaboliza en un 99% a ácido salicílico y otros metabolitos que se eliminan vía renal, siendo excretada principalmente a través de la orina. Aproximadamente, un 75% se encuentra en forma de ácido salicílico, un 15 % está en forma de conjugados mono y di-glucorónicos mientras que el 10% restante son salicilatos libres [82]. El ASA se excreta por completo entre 4 y 6 horas después de su ingesta. La concentración encontrada de SAL en la muestra de orina analizada fue de $59 \pm 2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, contenido bastante inferior a lo esperado según los datos bibliográficos. Este menor contenido podría

deberse a una metabolización incompleta del ASA puesto que la muestra analizada se recogió a las 2 horas y 30 minutos de la ingesta del fármaco.

El ibuprofeno (IBU), por su parte, se metaboliza en el hígado, se elimina, principalmente, a nivel renal y se considera que la eliminación es completa al cabo de 24 horas. Aproximadamente un 90% se excreta en la orina como metabolitos o algunos de sus formas complejas mientras que el 10% restante se excreta en su forma original entre 6 y 8 horas después de su ingesta [83,84]. La cantidad encontrada en la muestra de orina analizada fue de $29 \pm 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de IBU.

Así pues, los resultados obtenidos indican que el procedimiento de extracción electrocinética propuesto utilizando 1-nonanol modificado con un 2.5% (p/v) de Aliquat®336 como SLM en sistemas de EME estáticos que emplean láminas planas de polipropileno como soporte para la membrana líquida (FM-EME), puede aplicarse de forma satisfactoria para el análisis de antiinflamatorios no esteroideos en muestra de orina humana.

REFERENCIAS

- [1] M.H. Koruni, H. Tabani, H.G. Ali, R. Fakhari, An all-in-one electro membrane extraction: Development of an electro-membrane extraction method for the simultaneous extraction of acidic and basic drugs with a wide range of polarities, *J. Chromatogr. A* 1361 (2014) 95-99.
- [2] M. Balchen, A.G. Hatterud, L. Reubsaet, S. Pedersen-Bjergaard, Fundamental studies on the electrokinetic transfer of net cationic peptides across supported liquid membranes, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 186-195.

- [3] A. Šlampová, P. Kubáň, P. Boček, Effects of selected operational parameters on efficacy and selectivity of electromembrane extraction: chlorophenols as model analytes, *Electrophoresis* 35 (2014) 2429-2437.
- [4] A. Šlampová, P. Kubáň, P. Boček, Fine-tuning of electromembrane extraction selectivity using 18-crown-6ethers as supported liquid membrane modifiers, *Electrophoresis* 35 (2014) 3317-3320.
- [5] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, Development and application of carbon nanotubes assisted electromembrane extraction (CNTs/EME) for the determination of buprenorphine as a model of basic drugs from urine samples, *Anal. Chim. Acta* 767 (2013) 75-80.
- [6] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, H. Ahmar, A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using carbon nanotube reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked plasma, urine, breast milk and wastewater samples, *J. Chromatogr. A* 1285 (2013) 1-6.
- [7] X.Y. Song, J. Chen, Y.P. Shi, Electromembrane extraction based on carbon nanotubes reinforced hollow fiber for the determination of plant hormones, *New J. Chem.* 39 (2015) 9191-9199.
- [8] A. Fashi, F. Khanban, M.R. Yaftian, A. Zamani, The cooperative effect of reduced graphene oxide and Triton X-114 on the electromembrane microextraction efficiency of Pramipexole as a model analyte in urine samples, *Talanta* 162 (2017) 210-217.
- [9] H. Bagheri, A.F. Zavareh, M.H. Koruni, Graphene oxide assisted electromembrane extraction with gas chromatography for the determination of methamphetamine as a model analyte in hair and urine samples, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 1182-1188.
- [10] A. Fashi, F. Khanban, M.R. Yaftian, A. Zamani, Improved electromembrane microextraction efficiency of chloramphenicol in dairy products: the cooperation of reduced graphene oxide and a cationic surfactant, *RSC Adv.* 6 (2016) 112748-112755.

- [11] A. Atarodi, M. Chamsaz, A.Z. Moghaddam, H. Tabani, Introduction of fullerene as a new carrier in electromembrane extraction for the determination of ibuprofen and sodium diclofenac as model acidic drugs in real urine samples, *Chromatographia* 80 (2017) 881-890.
- [12] M. Khajeh, S. Pedersen-Bjergaard, M. Bohlooli, A. Barkhordar, M. Ghaffari-Moghaddam, Maghemite nanoparticles-decorated hollow fiber-electromembrane extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction for determination of thymol from *Carum Copticum* J. Sci. Food Agric. 97 (2017) 1517-1523.
- [13] M. Ramos-Payán, R. Fernández-Torres, J.L. Pérez-Bernal, M. Callejón-Mochón, M.A. Bello-López, A novel approach for electromembrane extraction based on the use of silver nanometallic-decorated hollow fibers, *Anal. Chim. Acta* 849 (2014) 7-11.
- [14] Z. Tahmasebi, S.S.H. Davarani, A.A. Asgharinezhad, Highly efficient electrochemical determination of propylthiouracil in urine samples after selective electromembrane extraction by copper nanoparticles decorated hollow fibers, *Biosens. Bioelectron.* 114 (2018) 66-71.
- [15] A. Rahimi, S. Nojavan, Electromembrane extraction of verapamil and riluzole from urine and wastewater samples using a mixture of organic solvents as a supported liquid membrane: Study on electric current variations, *J. Sep. Sci.* 42 (2) (2019) 566-573.
- [16] C. Huang, A. Gjelstad, K.F. Seip, H. Jensen, S. Pedersen-Bjergaard, Exhaustive and stable electromembrane extraction of acidic drugs from human plasma. *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 81-87.
- [17] K.F. Seip, J. Stigsson, A. Gjelstad, M. Balchen, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of peptides-fundamental studies on the supported liquid membrane. *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 3410-3417.
- [18] S. Nojavan, T. Bidarmanesh, A. Mohammadi, S. Yaripour, Electromembrane extraction of gonadotropin-releasing hormone agonists from plasma and wastewater samples, *Electrophoresis* 37 (2016) 826-833.

- [19] H. Tabani, A.R. Fakhari, E. Zand, Low-voltage electromembrane extraction combined with cyclodextrin modified capillary electrophoresis for the determination of phenoxy acid herbicides in environmental samples. *Anal. Methods* 5 (2013) 1548-1555.
- [20] P. Zahedi, S.S.H. Davarani, H.R. Moazami, S. Nojavan, Surfactant assisted pulsed two-phase electromembrane extraction followed by GC analysis for quantification of basic drugs in biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 117 (2016) 485-491.
- [21] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, Application of nonionic surfactant as a new method for the enhancement of electromembrane extraction performance for determination of basic drugs in biological samples, *J. Chromatogr. A* 1378 (2015) 1-7.
- [22] A.R. Fakhari, K.S. Hasheminasab, Z. Aladaghlo, M.H. Koruni, Surfactant assisted electromembrane extraction combined with capillary electrophoresis as a novel technique for the determination of acidic drugs in biological fluids, *Electrophoresis* 36 (2015) 3034-3041.
- [23] A. Ávalos, A.I. Haza, D. Mateo, P. Morales, Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente, *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 7 (2) (2013) 1-23.
- [24] U.T. Khatoon, K.V. Rao, J.V.R. Rao, Y. Aparna, Synthesis and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method, *Int. Conf. Nanosci. Eng. Technol. (ICONSET 2011)* 9 (5) (2011) 97-99.
- [25] M.T. Frejo, M.J. Díaz, M. Lobo, J. García, M. Capó, Nanotoxicología ambiental: retos actuales. *Medicina Balear* 26 (2) (2011) 36-46.
- [26] M. Monge Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas, *An. Quím.* 105 (1) (2009) 33-41.
- [27] R. Zanella, Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño, *Mundo nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología* 5 (2012) 69-81.

- [28] E.E. Ghasemi, N.M. Najafi, F. Raofie, A. Ghassempour, Simultaneous speciation and preconcentration of ultra-traces of inorganic tellurium and selenium in environmental samples by hollow fiber liquid phase microextraction prior to electrothermal atomic absorption spectroscopy determination, *J. Hazard. Mater.* 181 (2010) 491-496.
- [29] X. Pu, B. Chen, B. Hu, Solvent bar microextraction combined with electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of inorganic arsenic in water samples, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 679-684.
- [30] M.A. Maurer-Jones, Y.S. Lin, C.L. Haynes, Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano* 4 (2010) 3363-3373.
- [31] E. Caballero Díaz. Nanopartículas como herramientas analíticas y estudios toxicológicos asociados, Tesis Doctoral (2014), Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
- [32] S.E.F. Kleijn, S.C.S. Lai, M.T.M. Koper, P.R. Unwin, Electrochemistry of nanoparticles, *Angewandte Chemie-International Edition* 53 (2014) 3558-3586.
- [33] M.A.M. Khan, S. Kumar, M. Ahamed, S.A. Alrokayan, M.S. AlSalhi, Structural and thermal studies of silver nanoparticles and electrical transport study of their thin films, *Nanoscale Research Letters* 6 (2011) 434-441.
- [34] J.T. Wu, S.L.C. Hsu, Preparation of triethylamine stabilized silver nanoparticles for low-temperature sintering, *J. Nanopart. Res.* 13 (9) (2011) 3877-3883.
- [35] A. Frattini, N. Pellegrini, D. Nicastro, O. de Sanctis, Preparación y caracterización de nanopartículas de plata, *Anales AFA.* 15 (2003) 260-263.
- [36] P.V. Dong, C.H. Ha, L.T. Binh, J. Kasbohm, Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. *International Nano Letters* 2 (2012) 1-9.
- [37] J.L. Rodríguez-López, J.M. Montejano-Carrizales, J.P. Palomares-Báez, H. Barrón-Escobar, J.J. Velázquez-Salazar, J.M. Cabrera-Trujillo, M. José-Yacamán, Size Effect and Shape Stability of Nanoparticles, *Key Engineering Materials* 444 (2010) 47-68.

- [38] A. Mirzaei, K. Janghorban, B. Hashemi, M. Bonyani, S.G. Leonardi, G. Neri, Characterization and optical studies of PVP-capped silver nanoparticles, *J. Nanostruct. Chem.* 7 (1) (2017) 37-46.
- [39] M.A. Shenashen, S.A. El-Safty, E.A. Elshehy, Synthesis, Morphological Control, and Properties of Silver Nanoparticles in Potential Applications, Part. Part. Syst. Charact. 31 (2014) 293-316.
- [40] Z. Khan, S.A. Al-Thabaiti, A.Y. Obaid, A.O. Al-Youbi, Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 82 (2011) 513-517.
- [41] V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin, Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, *Adv. Colloid Interface Sci* 145(1) (2009) 83-96.
- [42] S. Mehta, S. Chaudhary, M. Gradzielski, Time dependence of nucleation and growth of silver nanoparticles generated by sugar reduction in micellar media, *J. Colloid Interface Sci.* 343 (2) (2010) 447-453.
- [43] S. Iravani, H. Korbekandi, S.V. Mirmohammadi, B. Zolfaghari, Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods, *Res. Pharm. Sci.* 9 (6) (2014) 385-406.
- [44] T.Y. Tan, C. Basheer, K.P. Ng, H.K. Lee Electro membrane extraction of biological anions with ion chromatographic analysis. *Anal. Chim. Acta* 739 (2012) 31-36.
- [45] A.I. López-Lorente, B.M. Simonet, M. Valcárcel, Analytical potential of hybrid nanoparticles, *Anal Bioanal. Chem.* 399 (2011) 43-54.
- [46] S. Yu, Y. Yin, J. Liu, Silver nanoparticles in the environment, *Environ. Sci. Processes Impacts* 15 (2013) 78-92.

[47] H. Jiang, B. Hu, B. Chen, L. Xia, Hollow fiber liquid phase microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of arsenic (III) and arsenic (V) in fresh waters and human hair extracts, *Anal. Chim. Acta* 634 (2009) 15-21.

[48] Y. Zhang, J. Sun, A study on the bio-safety for nano-silver as anti-bacterial materials, *Chin. J. Med. Instrument.* 31 (2007) 35-38.

[49] D. Cheng, J. Yang, Y. Zhao, Antibacterial materials of silver nanoparticles application in medical appliances and appliances for daily use, *Chin. J. Med. Equip.* 4 (2004) 26-32.

[50] M.S. Cohen, J.M. Stern, A.J. Vanni, R.S. Kelley, E. Baumgart, D. Field, J.A. Libertino, I.C. Summerhayes, In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh, *Surg. Infect.* 8 (2007) 397-403.

[51] C. Chen, C. Chiang, Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles, *Mater. Lett.* 62 (2008) 3607-3609.

[52] C. Román-Hidalgo, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, M.J. Martín-Valero, M.A. Bello-López, Agar films containing silver nanoparticles as new support for electromembrane extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1519-1525.

[53] K.M.M. Abou El-Nour, A. Eftaiha, A. Al-Warthan, R.A.A. Ammar, Synthesis and applications of silver nanoparticles, *Arabian Journal of Chemistry* 3 (2010) 135-140.

[54] A.R.M. Bustos, J.R. Encinar, A. Sanz-Medel, Mass spectrometry for the characterisation of nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 5637-5643.

[55] A.P. Kulkarni, K. Munechika, K.M. Noone, J.M. Smith, D.S. Ginger, Phase Transfer of Large Anisotropic Plasmon Resonant Silver Nanoparticles from Aqueous to Organic Solution, *Langmuir* 25 (14) (2009) 7932-7939.

[56] X. Feng, H. Ma, S. Huang, W. Pan, X. Zhang, F. Tian, C. Gao, Y. Cheng, J. Luo, Aqueous–Organic Phase-Transfer of Highly Stable Gold, Silver, and Platinum Nanoparticles

and New Route for Fabrication of Gold Nanofilms at the Oil/Water Interface and on Solid Supports, *J. Phys. Chem. B* 110 (25) (2006) 12311-12317.

[57] S. Si, E. Dinda, T.K. Mandal, In situ synthesis of gold and silver nanoparticles by using redox-active amphiphiles and their phase transfer to organic solvents, *Chemistry* 13 (35) (2007) 9850-9861.

[58] E. Dinda, M. Biswas, T.K. Mandal, Morphological Transition during Reversible Aqueous and Organic Phase Transfer of Gold Nanostructures Synthesized by Tyrosine-Based Amphiphiles, *J. Phys. Chem. B* 115 (38) (2011) 18518-18530.

[59] M. Villar-Navarro, M. Ramos-Payán, R. Fernández-Torres, M.A. Bello-López, M. Callejón-Mochón, A. Guiráum-Pérez, Capillary electrophoresis determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in wastewater using hollow fiber liquid-phase microextraction, *Electrophoresis* 32 (16) (2011) 2107-2113.

[60] M. Ramos Payán, M.A. Bello López, R. Fernández-Torres, M. Villar-Navarro, M. Callejón-Mochón, Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples, *Talanta* 85 (1) (2011) 394-399.

[61] M. Balchen, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane, *J. Chromatogr. A* 1152 (1-2) (2007) 220-225.

[62] J.M. Kim, S.W. Myung, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by HPLC-UV/Vis analysis coupled with electromembrane extraction, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 39 (2018) 335-340.

[63] S. Yaripour, A. Mohammadi, S. Nojavan, Electromembrane extraction of tartrazine from food samples: effects of nano-sorbents on membrane performance, *J. Sep. Sci.* 39 (13) (2016) 2642-2651.

[64] S. Nojavan, T. Rahmani, S. Mansouri, Selective Determination of Chromium (VI) in Industrial Wastewater Samples by Micro-Electromembrane Extraction Combined with Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *Water, Air and Soil Pollution* 229 (3) (2018) 89.

[65] N.A. Mamat, H.H. See, Simultaneous electromembrane extraction of cationic and anionic herbicides across hollow polymer inclusion membranes with a bubbleless electrode, *J. Chromatogr. A* 1504 (2017) 9-16.

[66] M.S. Restan, M.E. Pedersen, H. Jensen, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane Extraction of Unconjugated Fluorescein Isothiocyanate from Solutions of Labeled Proteins Prior to Flow Induced Dispersion Analysis, *Anal. Chem.* 91 (10) (2019) 6702-6708.

[67] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of polar basic drugs from plasma with pure bis(2-ethylhexyl) phosphite as supported liquid membrane, *Anal. Chim. Acta* 934 (2016) 80-87.

[68] C. Román-Hidalgo, M.J. Martín-Valero, R. Fernández-Torres, M.A. Bello-López, New nanostructured support for carrier-mediated electromembrane extraction of high polar compounds, *Talanta* 162 (2016) 32–37.

[69] H.H. See, N.A. Mamat, P. C. Hauser, Flow Injection Analysis with Direct UV Detection Following Electric Field Driven Membrane Extraction, *Molecules* 23 (5) (2018) 1000.

[70] L. Ryšavá, M. Dvořák, P. Kubáň, The effect of membrane thickness on supported liquid membrane extractions in-line coupled to capillary electrophoresis for analyses of complex samples, *J. Chromatogr. A* 1596 (2019) 226-232.

[71] C. Román-Hidalgo, M.J. Martín Valero, R. Fernández-Torres, M.A. Bello-López, Use of Polymer Inclusion Membranes (PIMs) as support for electromembrane extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and highly polar acidic drugs, *Talanta* 179 (2018) 601-607.

[72] S. Asadi, H. Tabani, S. Nojavan, Application of polyacrylamide gel as a new membrane in electromembrane extraction for the quantification of basic drugs in breast milk and wastewater samples, *J. Pharm.Biomed. Anal.* 151 (2018) 178-185.

[73] S. Sedehi, H. Tabani, S. Nojavan, Electro-driven extraction of polar compounds using agarose gel as a new membrane: Determination of amino acids in fruit juice and human plasma samples, *Talanta* 179 (2018) 318-325.

[74] C. Huang, H. Jensen, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen Bjergaard. Mass transfer in electromembrane extraction-The link between theory and experiments, *J. Sep. Sci.* 39 (1) (2016) 188-197.

[75] Y.A. Asl, Y. Yamini, M. Rezazadeh, S. Seidi, Electromembrane extraction using a cylindrical electrode: A new view for the augmentation of extraction efficiency, *Anal. Methods* 7 (1) (2015) 197-204.

[76] H.R. Moazami, S.S.H. Davarani, J. Mohammadi, S. Nojavan, M. Abrari, The effect of electric field geometry on the performance of electromembrane extraction systems: Footprints of a third driving force along with migration and diffusion. *Anal. Chim. Acta* 891 (2015) 151-159.

[77] S. Asadi, H. Tabani, K. Khodaei, F. Asadian, S. Nojavan, Rotating electrode in electro membrane extraction: a new and efficient methodology to increase analyte mass transfer, *RSC Advances* 6 (104) (2016) 101869-101879.

[78] H.R. Moazami, S.S.H. Davarani, M. Abrari, A. Elahi, Electromembrane Extraction Using a Round-Headed Platinum Wire as the Inner Electrode: A Simple and Practical Way to Enhance the Performance of Extraction, *Chromatographia* 81 (7) (2018) 1023-1033.

[79] C. Huang, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Organic solvents in electromembrane extraction: Recent insights, *Reviews in Anal. Chem.* 35 (4) (2016) 169-183.

[80] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction for pharmaceutical and biomedical analysis-Quo vadis, *J. Pharm. Biom. Anal.* 113 (2015) 97-107.

[81] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed. Prentice Hall, London, 2000.

[82] B.S. Siddiqui, H.N. Bhatti , A. Ijaz , S. Rasheed, B. Saleem , Urinary Excretion of Acetylsalicylic Acid in Healthy Male Volunteers, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6 (2003) 1413-1415.

[83] R. Bushra, N. Aslam, An overview of clinical pharmacology of ibuprofen, *Oman Medical Journal* 25 (3) (2010) 155-161.

[84] E.J. Antal, C.E. Wright, B.L. Brown, K.S. Albert, L.C. Aman, N.W. Levin, The influence of hemodialysis on the pharmacokinetics of ibuprofen and its major metabolites, *J. Clin. Pharmacol.* 26 (3) (1986) 184-190.

CONCLUSIONES

1. Se han optimizado e implementado diferentes procedimientos de extracción mediante electromembrana (EME) para la determinación simultánea de cinco antiinflamatorios no esteroideos: ácido salicílico (SAL), ketoprofeno (KTP), naproxeno (NAX), diclofenaco (DIC) e ibuprofeno (IBU), mediante el empleo de tres dispositivos experimentales que difieren en forma, geometría y estructura.

2. Se ha puesto de manifiesto que la naturaleza de las fases donadoras yceptoras influye significativamente sobre la eficacia de la extracción en una configuración clásica (HF-LPME). Los mejores resultados se obtienen en presencia de KOH en la fase donadora y de NaOH en la fase aceptora. Este comportamiento pone de manifiesto que, tanto el flujo de los analitos a través de la membrana líquida como la selectividad de la técnica, se ven afectados por el tipo de contraión presente en el medio en el momento de la extracción, obteniéndose factores de enriquecimiento 4 veces mayores que los previamente descritos hasta la fecha, con límites de detección comprendidos entre 0.1 y 1.5 ng mL⁻¹ y límites de cuantificación entre 0.3 y 3 ng mL⁻¹.

3. El método propuesto utilizando el sistema HF-EME se ha empleado con muy buenos resultados en la determinación de naproxeno e ibuprofeno en muestras de orina humana pertenecientes a voluntarios bajo tratamiento médico.

4. Se ha optimizado un procedimiento de extracción electrocinética utilizando un dispositivo microfluídico (μ F-EME) que utiliza soportes planos para la inmovilización del disolvente orgánico y que opera en modo semi-dinámico. El método propuesto emplea volúmenes reducidos de muestra

(del orden de los microlitros) y permite la extracción exhaustiva de muestras acuosas, con recuperaciones prácticamente del 100%, de todos los analitos seleccionados en tan sólo 10 minutos y aplicando un voltaje de 10 voltios.

5. Se ha puesto a punto un procedimiento de extracción mediante electromembrana empleando un dispositivo que utiliza láminas planas de polipropileno como soporte para la membrana líquida orgánica y que opera en condiciones estáticas (FM-EME). La extracción se llevó a cabo empleando un volumen de fase donadora de 10 mL y se completó en 12 minutos, aplicando una diferencia de potencial de 80 voltios. La sensibilidad del método alcanza límites de detección comprendidos entre 0.8 y 3.5 ng mL⁻¹ y límites de cuantificación que oscilan entre 2.5 y 10 ng mL⁻¹.

6. Los métodos propuestos empleando los sistemas μ F-EME y FM-EME, se han aplicado con éxito para la extracción de todos los antiinflamatorios no esteroideos estudiados en muestras de orina humana, proporcionadas por voluntarios sanos, fortificadas a tres niveles de concentración.

7. Se han sintetizado nanopartículas de plata (AgNPs) esféricas según un procedimiento de reducción química que emplea borohidruro de sodio como reductor. Se ha logrado transferir satisfactoriamente dichas nanopartículas desde un medio acuoso al disolvente orgánico que se emplea como membrana líquida. Tanto la dispersión acuosa como la orgánica, se han caracterizado espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-vis) y microscopía de transmisión electrónica (TEM).

8. El disolvente orgánico modificado con AgNPs se ha utilizado como membrana líquida en dos tipos de sistemas: uno que emplea soportes físicos para fijar la membrana líquida (HF-EME) y otro que emplea membranas líquidas libres (μ -EME). En ambos casos, se ha comprobado que la presencia de AgNPs en la membrana líquida no produce ninguna mejora en la eficacia del procedimiento de extracción.

9. Se ha modificado la membrana líquida con Aliquat[®]336 incorporando diferentes cantidades del *carrier* en el disolvente orgánico. El efecto de la presencia de Aliquat[®]336 en la membrana líquida se ha evaluado en sistemas HF-EME y FM-EME, obteniéndose mejoras en la eficacia de la extracción en los dispositivos FM-EME. Los mejores resultados se obtienen al sustituir 1-octanol por 1-nonanol + 2.5% (p/v) de Aliquat[®]336 como membrana líquida, con recuperaciones comprendidas entre el 38 y el 53%. Estos resultados mejoran entre un 56 y un 96% a los obtenidos con 1-octanol y proporcionan límites de detección comprendidos entre 0.02 y 2 ng mL⁻¹ así como límites de cuantificación que se sitúan entre 0.04 y 3 ng mL⁻¹.

10. El procedimiento de extracción propuesto se ha aplicado para el análisis de los analitos seleccionados en muestras de orina humana procedentes de voluntarios sanos, fortificadas a tres niveles de concentración, con recuperaciones comprendidas entre el 78 y el 99%. Así mismo, se ha demostrado que es válido para determinar ácido salicílico e ibuprofeno en muestras de orina correspondientes a voluntarios bajo tratamiento médico.

CONCLUSIONES

11. Todos los métodos de extracción optimizados ofrecen una extraordinaria selectividad así como un excelente *clean-up* en muestras de orina, lo que permite la inyección directa de los extractos resultantes en los sistemas instrumentales de análisis.

CONCLUSIONS

1. Several electromembrane extraction (EME) procedures have been optimized and implemented for the simultaneous determination of five non-steroidal anti-inflammatory drugs: salicylic acid (SAC), ketoprofen (KTP), naproxen (NAX), diclofenac (DIC) and ibuprofen (IBU), using three experimental devices with different shape, geometry and structure.

2. The nature of donor and acceptor solutions has a significant influence in the extraction efficiency when a classical configuration is used (HF-LPME). The best results are obtained when KOH is used to adjust pH of the donor phase and NaOH for the acceptor phase. This behaviour shows that the type of counterion present in both solutions affects the migration of the analytes through the liquid membrane and the selectivity of the technique. Under the optimal conditions enrichment factors 4 times higher than those previously reported have been obtained, with detection limits within 0.1 and 1.5 ng mL⁻¹ and quantification limits within 0.3 and 3 ng mL⁻¹.

3. The proposed method using HF-EME system has been satisfactory applied for the determination of naproxen and ibuprofen in human urine samples provided by volunteers under medical treatment.

4. An electrokinetic extraction procedure using a microfluidic device (μ F-EME) with the organic solvent immobilized in a flat membrane, operating in a semi-dynamic mode have been optimized. The proposed method allows reduced sample volumes (microliters order) and a selective

CONCLUSIONS

extraction from aqueous samples, obtaining recoveries near to 100% of all selected analytes in 10 minutes applying only 10 volts.

5. An electromembrane extraction procedure has been developed using a device that accurates polypropylene flat membranes as support for the organic liquid membrane and works under stagnant conditions (FM-EME). The extraction was carried out using 10 mL of donor phase and was completed in 12 minutes, applying a potential of 80 volts. The method provides detection limits between 0.8 and 3.5 ng mL⁻¹ and quantification limits ranging from 2.5 to 10 ng mL⁻¹.

6. The proposed μ F-EME and FM-EME procedures have been successfully applied for the extraction of the studied non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine samples, from healthy volunteers, fortified at three concentration levels.

7. Spherical silver nanoparticles (AgNPs) have been synthesized according to a chemical reduction process that employs sodium borohydride as reductant. These nanoparticles have been successfully transferred from an aqueous medium to organic solvent. Both, aqueous and organic dispersions have been characterized by ultraviolet-visible absorption spectroscopy (UV-vis) and electron transmission microscopy (TEM).

8. The organic solvent modified with AgNPs has been used as liquid membrane in HF-EME and μ -EME. The presence of AgNPs in the liquid membrane does not lead to an improvement in the EME extraction efficiency with any of the assayed systems.

9. The liquid membrane has been modified with Aliquat®336 by adding different amounts of carrier in the organic solvent. It has been evaluated its effect on the EME process using HF-EME and FM-EME setups, obtaining better extraction efficiencies only with FM-EME devices. The best results are obtained when 1-octanol is replaced with 1-nonanol + 2.5% (w/v) of Aliquat®336 as liquid membrane, achieving recoveries within 38 and 53%. These results improve between 56 and 96% the ones obtained with 1-octanol and provide detection limits between 0.02 and 2 ng mL⁻¹ as well as quantification limits ranging 0.04 and 3 ng mL⁻¹.

10. The optimized extraction procedure has been applied to determine the selected analytes in human urine samples from healthy volunteers, in samples fortified at three concentration levels, obtaining recoveries within 78 and 99%. Likewise, the method was also applied for determining salicylic acid and ibuprofen in urine samples belonging to volunteers under medical treatment.

11. All optimized extraction methods offer an extraordinary selectivity as well as an excellent clean-up from urine samples, allowing the direct injection of the extracts into the instrumental analysis systems.

ANEXO. Publicaciones científicas derivadas
de la tesis
